

TRANSLATION OF PRIORITY DOCUMENT

I, Hyun Jin HWANG, hereinafter called the translator, residing No. 102-701 JoongAng Heights Apt., 14-1 Samsung-dong, Seoul 135-507, Republic of Korea, do hereby declare that I have translated faithfully the certified copy of the application entitled METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES BY USING THERMAL CONVECTION having a Korean application No. 10-2001-0057040, filed on September 15, 2001, into English.

This 12th day of JAN., 2007

Translator:


Hyun Jin HWANG

* Enclosure: Translation of Priority Document

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office

Application Number: 10-2001-0057040

Date of Application: SEP 15, 2001

Applicant(s): AHRAM BIOSYSTEMS INC.

December 28, 2006

COMMISSIONER

【RECORDS】

【Title of Document】 Amendment

【Receiver】 Commissioner

【Submission Date】 2001. 09. 17

【Presenter】

【Name】 AHRAM BIOSYSTEMS INC.

【Applicant's Code】 1-2001-029413-9

【Relation to the Case】 Applicant

【Attorney】

【Name】 KIM, Dongjin

【Attorney's Code】 9-2001-000322-5

【Identification of the Case】

【Application Number】 10-2001-0057040

【Application Date】 September 15,2001

【Date of Requesting Examination】 September 15,2001

【Title】 METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF
NUCLEIC ACID SEQUENCES BY USING THERMAL
CONVECTION

【Cause of the Submission】

【Receipt Number】 1-1-01-0237001-64

【Receipt Date】 September 15,2001

【Document for Amendment】 Specification etc.

【Amendment to be made】

【Items to be amended】 As enclosed

【Method of Amendment】 As enclosed

【Contents of Amendment】 As enclosed

【Order】 I/We file as above according to Article 13 of the Regulations of the
Patent Law, and Article 8 of the Regulations of the Practical New
Device Law.

Attorney

KIM, Dongjin (seal)

【Fee】

【Amendment Fee】

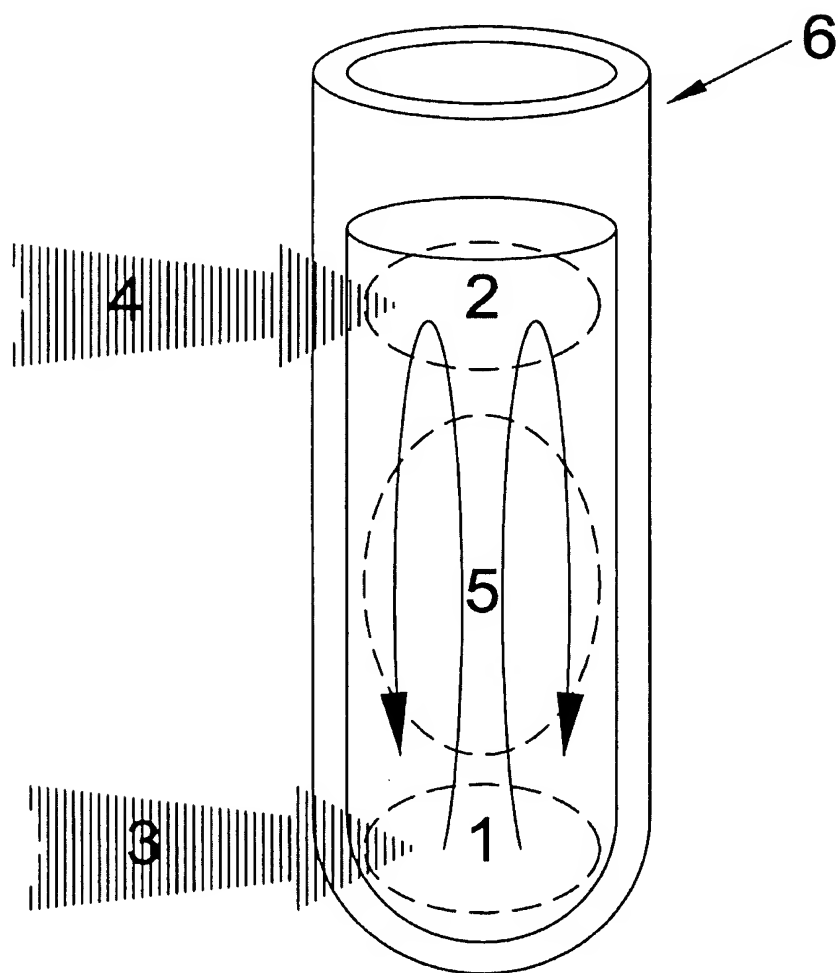
0 won

【Additional Examination Fee】 0 won

【Other Fees】 0 won

【Total】 0 won

【Documents Enclosed】 1. Proof document for the amendment (a part of
the Specification consisting of Figures 1, 2, 3,
4, 5, 6, and 7) 1 copy

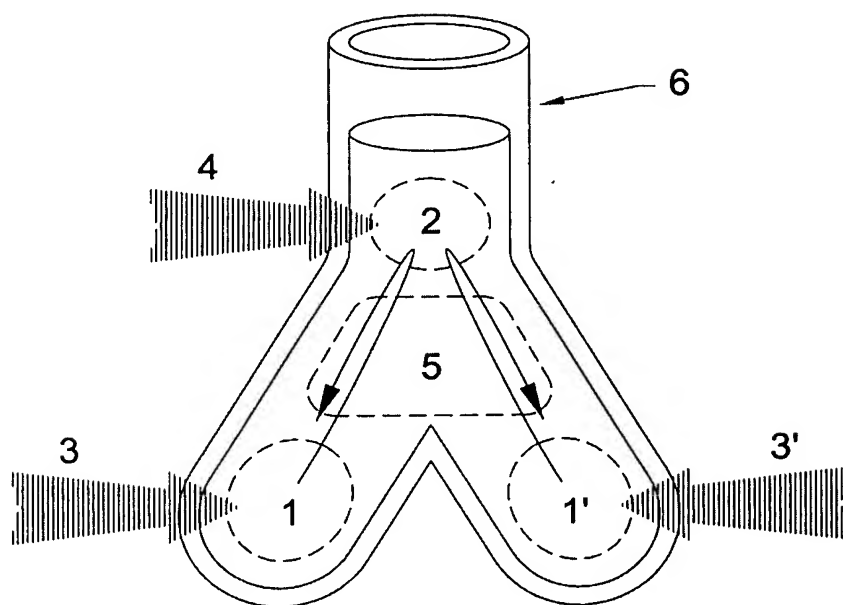
【Amendment】**【Item to be amended】** Figure 1**【Method of Amendment】** Correction**【Contents of Amendment】****【Figure 1】**

【Item to be amended】 Figure 2a

【Method of Amendment】 Correction

【Contents of Amendment】

【Figure 2a】

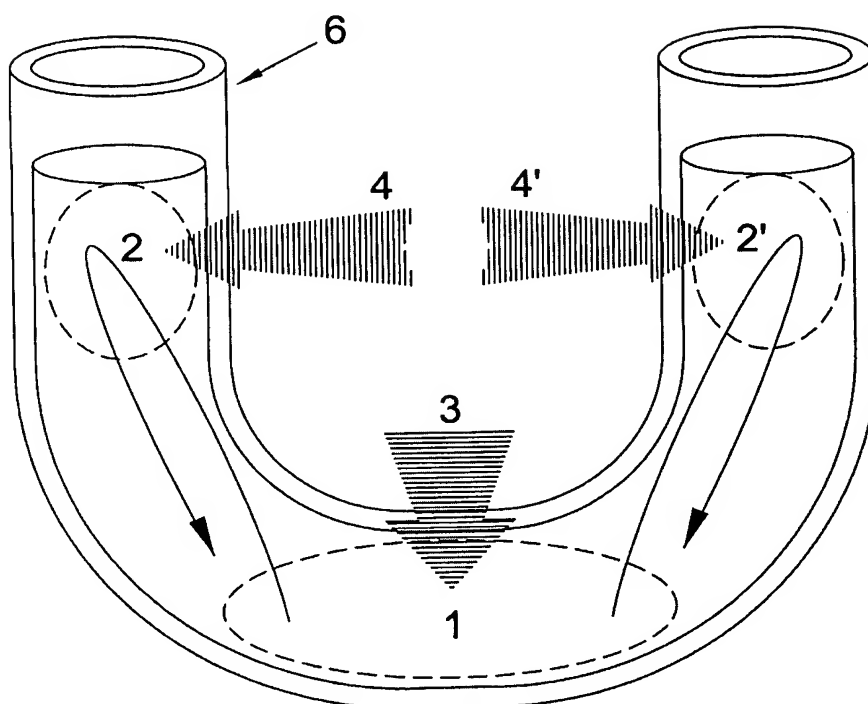


【Item to be amended】 Figure 2b

【Method of Amendment】 Correction

【Contents of Amendment】

【Figure 2b】

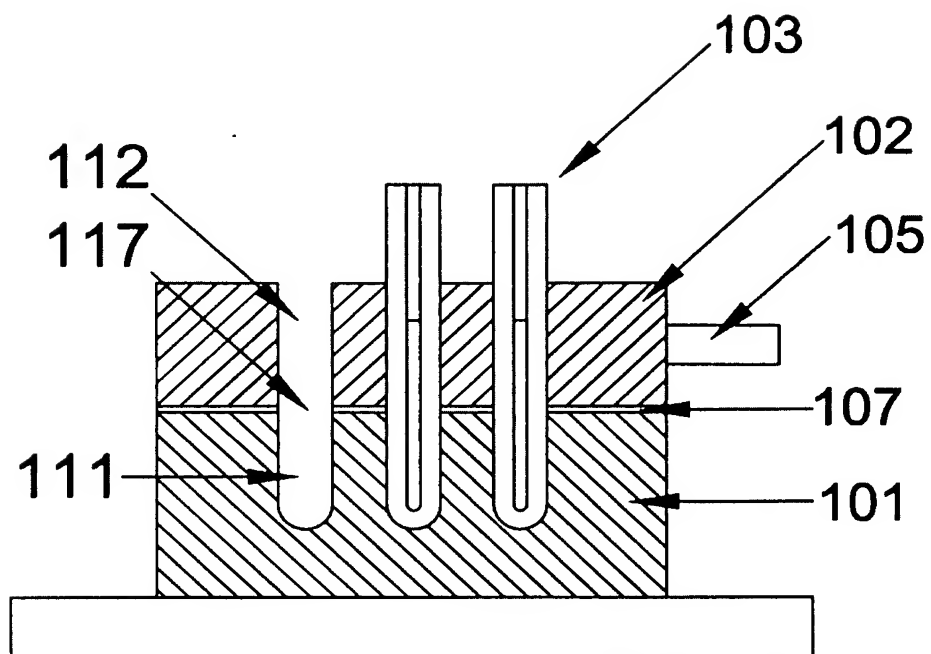


【Item to be amended】 Figure 3a

【Method of Amendment】 Correction

【Contents of Amendment】

【Figure 3a】

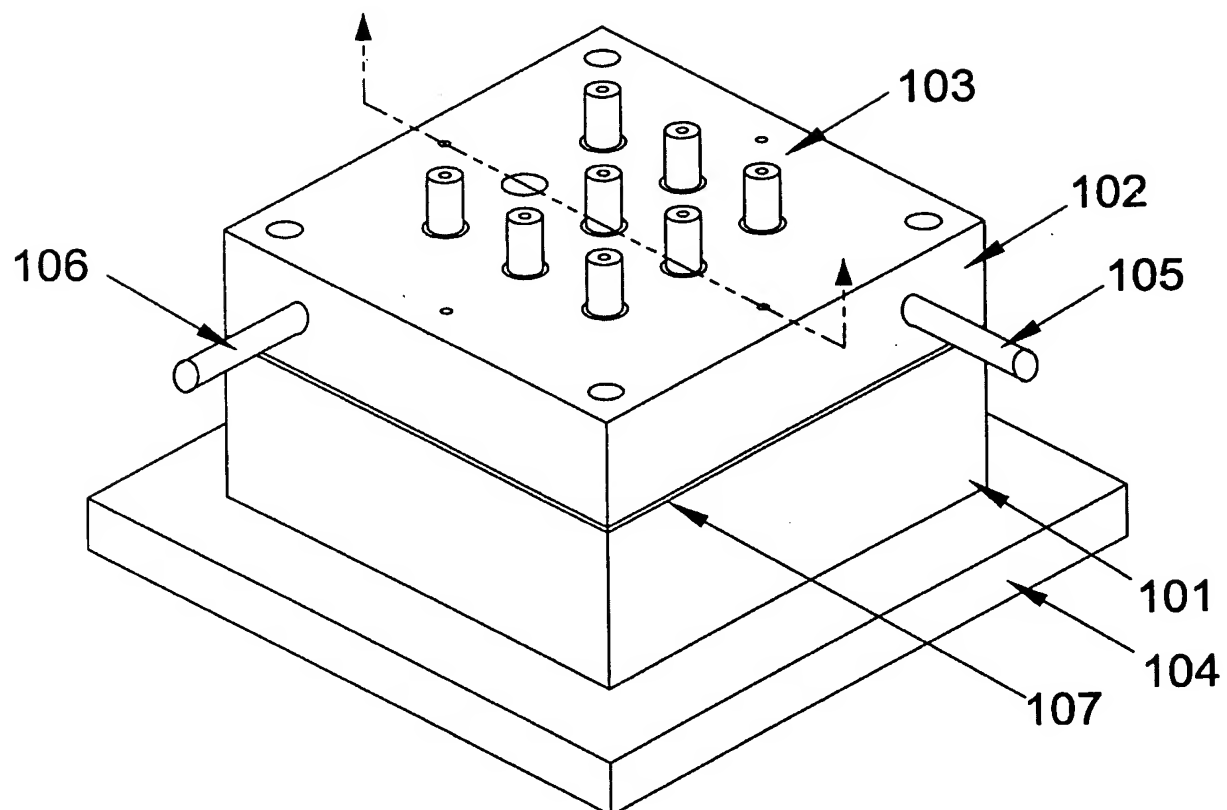


【Item to be amended】 Figure 3b

【Method of Amendment】 Correction

【Contents of Amendment】

【Figure 3b】

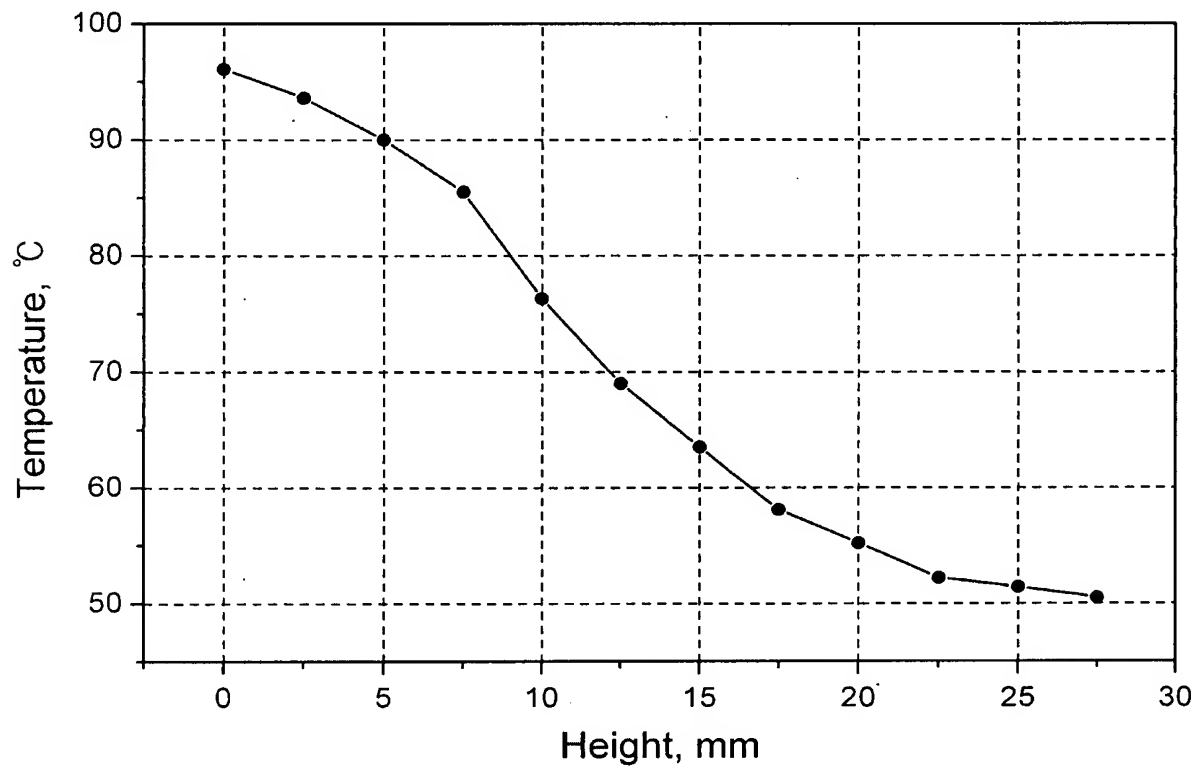


【Item to be amended】 Figure 4

【Method of Amendment】 Correction

【Contents of Amendment】

【Figure 4】

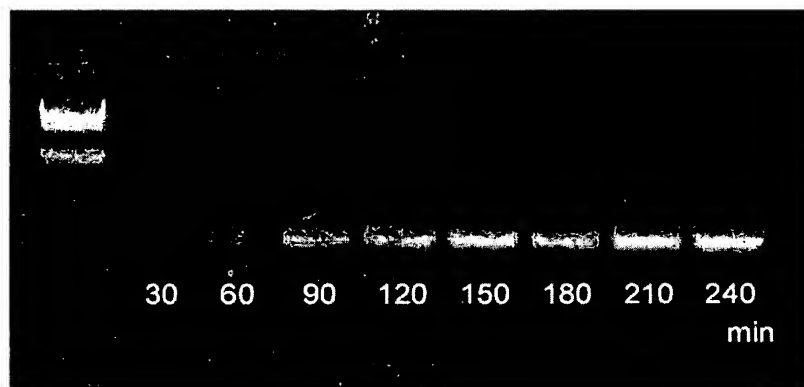


【Item to be amended】 Figure 5

【Method of Amendment】 Correction

【Contents of Amendment】

【Figure 5】

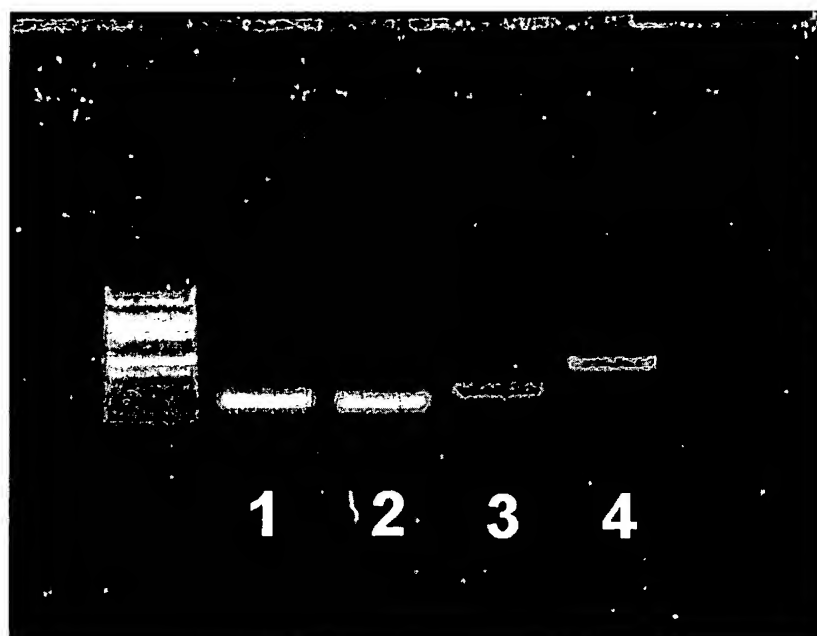


【Item to be amended】 Figure 6

【Method of Amendment】 Correction

【Contents of Amendment】

【Figure 6】

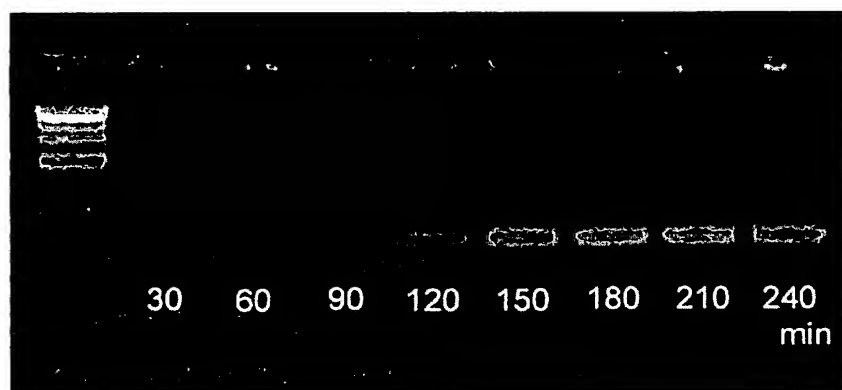


【Item to be amended】 Figure 7

【Method of Amendment】 Correction

【Contents of Amendment】

【Figure 7】



【RECORDS】

【Title of Document】 Patent Application

【Type of Right】 Patent

【Receiver】 Commissioner

【Reference Number】 0001

【Application Date】 2001. 09. 15

【IPC】 C12M

【Title】 METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC
ACID SEQUENCES BY USING THERMAL CONVECTION

【Applicant】

【Name】 AHRAM BIOSYSTEMS INC.

【Applicant's Code】 1-2001-029413-9

【Attorney】

【Name】 KIM, Dongjin

【Attorney's Code】 9-2001-000322-5

【Inventor】

【Name】 HWANG, Hyun Jin

【Resident Reg. No】 610112-1XXXXXXX

【Zip Code】 143-210

【Address】 No. 1012-1601 Hyundai Parkville,
577 Kwangjang-dong, Kwangjin-gu, Seoul

【Nationality】 Republic of Korea

【Inventor】

【Name】 KIM, Jeong Hee

【Resident Reg. No】 620121-2XXXXXXX

【Zip Code】 143-210

【Address】 No. 1012-1601 Hyundai Parkville,
577 Kwangjang-dong, Kwangjin-gu, Seoul

【Nationality】 Republic of Korea

【Inventor】

【Name】 JEONG, Kyunghoon

【Resident Reg. No】 730204-1XXXXXXX

【Zip Code】 503-062

【Address】 490-5, Bongseon-2-dong, Nam-gu,
Kwangjoo-Kwangyeok-si

【Nationality】 Republic of Korea

【Examination】 Requested

【Order】 I/We file as above according to Article 42 of the Patent law.
Attorney KIM, Dongjin (seal)

【Fee】

【Basic Filing Fee】 20 pages 29,000 won

【Additional Filing Fee】 19 pages 19,000 won

【Priority Claiming Fee】 0 case 0 won

【Examination Fee】 14 claims 557,000 won

【Total】 605,000 won

【Cause of Reduction】 Small Entity (70% reduction)

【Reduced Fee】 181,500 won

【Documents Enclosed】	1. Abstract, Specification (Drawings)	1 copy
	2. Power of Attorney	1 copy
	3. Proof for a Small Entity	1 copy

ABSTRACT

The present invention provides a nucleic acid sequence amplification method and apparatuses thereof that are simple in the design and easy to miniaturize and integrate into complex apparatuses, with capability of using DNA polymerases that are not thermostable. In the present invention, a plurality of heat sources are combined to supply heat to, or remove heat from specific regions of the sample such that a specific spatial temperature distribution is maintained inside the sample by locating a relatively high temperature region lower in height than a relatively low temperature region.

REPRESENTATIVE DRAWING

Figure 3a

KEY WORDS

Nucleic acid sequence amplification method, polymerase chain reaction, thermal convection, heat source, thermally conductive solid

TITLE OF THE INVENTION

METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES BY USING THERMAL CONVECTION

5

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows a schematic diagram of the operation principle of the nucleic acid sequence amplification method based on the thermal convection.

10 Figure 2a and 2b show schematic diagrams of the cases having more than three specific temperature regions in the sample.

Figure 3a and 3b show a cross sectional view and a perspective view, respectively, of the nucleic acid sequence amplification apparatus according to the present invention.

Figure 4 shows the temperature distribution of the sample at various heights in the reaction vessel.

15 Figure 5 is a photograph of the electrophoresis result illustrating results of Example 1 at various reaction times.

Figure 6 is a photograph of the electrophoresis result illustrating results of Example 2 for each pair of primers.

20 Figure 7 is a photograph of the electrophoresis result illustrating results of Example 3 at various reaction times.

Explanation on the numbers of the important parts in the drawings

25 1, 1': High temperature region
2, 2': Low temperature region
3, 4, 3', 4': Heat source
5: Convection region
6: Reaction vessel
101: First conduction block
30 102: Second conduction block
103: Reaction vessel

104: Heating device

105: Inlet of temperature control fluid

106: Outlet of temperature control fluid

107: Insulator

5 112, 117: Through hole

111: Opening

FILED OF THE INVENTION AND BACKGROUND ART

10 The present invention generally relates to methods and apparatuses for amplifying nucleic acid sequences. More particularly, it relates to methods and apparatuses using thermal convection, in which temperature controlled amplification processes including the polymerase chain reaction (PCR) and related processes can be performed to amplify target nucleic acid sequences from genetic samples containing DNA or RNA.

15

Nucleic acid sequence amplification technology has a wide application in bioscience, genetic engineering, and medical science for research and development and diagnostic purposes. In particular, the nucleic acid sequence amplification technology using PCR (hereafter referred to as "PCR amplification technology") has been most widely utilized. Details of the PCR amplification technology have been disclosed in US Pat. No. 4,683,202; 20 4,683,195; 4,800,159; and 4,965,188.

Various apparatuses and methods incorporating automated PCR amplification processes have been developed and used for fast and efficient amplification of a variety of genetic samples. The basic working principle of such technology is as follows. 25

In the commercialized PCR amplification technology, a sample is prepared to contain a template DNA to be amplified, a pair of oligonucleotide primers complementary to a specific sequence of each single strand of the template DNA, a thermostable DNA polymerase, and deoxynucleotide triphosphates (dNTP). A specific portion of the nucleic acid sequence of 30 the template DNA is then amplified by repeating a temperature cycle that sequentially

changes the temperature of the sample. Typically, the temperature cycle consists of three or two temperature steps, and the amplification processes during the temperature cycle occur in the following manner.

5 The first step is the denaturation step in which the sample is heated to a high temperature and double stranded DNAs become separated to single stranded DNAs. The second step is the annealing step in which the sample is cooled to a low temperature and the single stranded DNAs formed in the first step bind to the primers, forming partially double stranded DNA-primer complexes. The last step is the polymerization step in which the
10 sample is maintained at a suitable temperature and the primers in the DNA-primer complexes are extended by the action of the DNA polymerase, generating new single stranded DNAs that are complementary to each of the template DNA strands. The target nucleic acid sequences as selected by the sequences of the two primers are replicated during each cycle consisting of the above three steps. Typically, several millions or higher number of copies of the target
15 nucleic acid sequences can be produced by repeating the temperature cycles for about 20 to 40 times.

 The temperature of the denaturation step is typically 90-94°C. The temperature of the annealing step is controlled appropriately according to the melting temperatures (T_m) of the
20 primers used, and it typically ranges from 35 to 65°C. It is typical to set the temperature of the polymerization step to 72°C and use a three-step temperature cycle, since the most frequently used *Taq* DNA polymerase (a thermostable DNA polymerase extracted from *Thermus aquaticus*) has the optimal activity at that temperature. A two-step temperature cycle in which the polymerization temperature is set to the same as the annealing temperature,
25 can also be used since the *Taq* DNA polymerase has a broad temperature range of the polymerase activity.

 In the most widely used method, a reaction vessel containing the sample is made in contact with a solid metal block having a high thermal conductivity, and the temperature of
30 the solid metal block is changed by combining it with heating and cooling devices to achieve the desired temperature cycling of the sample. The commercial products adopting this type

of methods often use a gold-plated silver block that has very high thermal conductivity and/or the Peltier cooling method in order to achieve rapid temperature change. Recently, methods using a fluid such as gas or liquid as a heat source instead of the solid metal block, have been developed to achieve rapid temperature change, and products using such methods are being commercialized. In this type of methods, a fluid heated to a suitable temperature is circulated around the reaction vessel in a manner that an efficient thermal contact can be provided between the fluid heat source and the reaction vessel containing the sample. Other types of methods have also been developed to achieve rapid temperature cycling. Additional examples include a method of contacting the reaction vessel containing the sample or the sample itself sequentially with multiple heat sources each at a specific temperature, a method of heating the sample directly with infrared radiation, etc.

The prior nucleic acid sequence amplification apparatuses have a number of drawbacks as they operate to change the temperature of the whole sample according to the three- or two-step temperature cycle.

Firstly, the prior nucleic acid sequence amplification apparatuses of the temperature cycling type are complex in their design since processes for changing the sample temperature are necessary. In order to perform such temperature change processes, the method incorporating a solid metal block or a fluid as a heat source requires a means for controlling and changing the temperature of the heat source rapidly and uniformly and also a means for controlling the time interval of the temperature change. Similarly, the method of contacting the reaction vessel or the sample sequentially with multiple heat sources each at a specific temperature requires a means for moving the reaction vessel or the sample quickly and precisely and also a means for controlling the moving time and interval.

Secondly, it is difficult to integrate the prior nucleic acid sequence amplification apparatuses in a complex apparatus or a miniaturized device, due to their complicated design. Recently, miniaturized complex apparatuses are under development in the biotechnology field. For example, Lab-on-a-chip has been developed by integrating channels for sample passage, valves, pressure gauges, reaction vessels, detection units, etc. as a single unit on a glass,

silicon, or polymer plate using photolithography. Such miniaturized complex apparatuses are expected to have wide applications for various research and medical purposes. In the case that a nucleic acid sequence amplification apparatus needs to be integrated to such miniaturized chip, the prior method has a drawback in miniaturization because it requires a complex design to enable the temperature change processes. Furthermore, it is difficult to integrate the prior apparatuses in a complex apparatus in which rapid temperature change is not desirable.

Thirdly, the prior nucleic acid sequence amplification apparatuses can only use thermostable DNA polymerases such as *Taq* DNA polymerase. This is because the prior apparatuses have the process of heating the whole sample to a high temperature.

Finally, the prior nucleic acid sequence amplification apparatuses have a limitation for reducing the PCR reaction time. Since the prior apparatuses require the processes for changing the temperature of the whole sample, the PCR reaction time must take more time at least as much as the time needed for the temperature change.

TECHNICAL OBJECT OF THE INVENTION

The present invention is contrived to solve the above problems. It is an objective of the present invention to provide a new nucleic acid sequence amplification method and apparatuses thereof based on thermal convection. The new method and apparatuses according to the present invention achieve amplification of nucleic acid sequences by forming a plurality of specific regions having different temperatures inside the sample and thereby causing natural thermal convection of the sample to occur as a result of the temperature gradient among the different regions.

It is also an objective of the present invention to provide a method and apparatuses thereof that are simpler in their design and do not require complex components such as a means for changing the temperature in a controlled manner and a means for controlling the time interval of the temperature change as are required in the prior temperature cycling

methods and apparatuses.

Therefore, it is another objective of the present invention to provide a nucleic acid sequence amplification method and apparatuses thereof that are simpler than the prior art so that they can be readily miniaturized and thus integrated into complex miniaturized apparatuses such as Lab-on-a-chip.

It is still another objective of the present invention to provide a nucleic acid sequence amplification method and apparatuses thereof based on the thermal convection in which not only the thermostable DNA polymerases but also non-thermostable DNA polymerases can be used.

It is still further objective of the present invention to provide a more efficient nucleic acid sequence amplification method and apparatuses thereof that do not require the temperature change processes needed in the prior art.

Other objects and advantages of the invention will become clear to those skilled in the art from the following detailed description, claims, and drawings.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In order to achieve the above objectives, the present invention provides a new nucleic acid sequence amplification method and apparatuses thereof based on the novel thermal convection type operation principle described below.

To achieve the above objectives, the present invention provides a nucleic acid sequence amplification method using PCR, which method comprises:

a step of injecting into a reaction vessel a sample containing a template DNA having target nucleic acid sequences to be amplified, DNA polymerase, deoxyadenosine triphosphate, deoxycytidine triphosphate, deoxyguanosine triphosphate, deoxythymidine triphosphate, and at least two oligonucleotide primers

complementary to the 3' terminus of each of the target nucleic acid sequences; and
a step of maintaining a specific spatial temperature distribution in the sample by
contacting thermally with the sample a plurality of heat sources which supply heat
to, or remove heat from specific regions of the sample such that a relatively high
5 temperature region is located lower in height than a relatively low temperature
region,

wherein the specific spatial temperature distribution comprises spatial regions
fulfilling temperature conditions suitable for (i) a denaturation step in which double
stranded DNAs become separated to single stranded DNAs, (ii) an annealing step
10 in which the single stranded DNAs formed in the denaturation step hybridize to the
primers to form DNA-primer complexes, or (iii) a polymerization step in which the
primers in the DNA-primer complexes are extended by the polymerization
reaction,

and wherein the specific spatial temperature distribution is a temperature distribution
15 that induces circulation of the sample by thermal convection so that the
denaturation, annealing, and polymerization steps occur sequentially and
repeatedly inside the sample.

To achieve the above objectives, the present invention provides a nucleic acid
20 sequence amplification apparatus using PCR, which apparatus comprises:

a plurality of heat sources which may supply heat to, or remove heat from a plurality
of specific regions in a sample,

wherein the heat sources are arranged to maintain a specific spatial temperature
distribution in the sample such that a relatively high temperature region is located
25 lower in height than a relatively low temperature region,

wherein the specific spatial temperature distribution comprises spatial regions
fulfilling temperature conditions suitable for (i) a denaturation step in which double
strand DNAs become separated to single strand DNAs, (ii) an annealing step in
which the single strand DNAs formed in the denaturation step hybridize to the
30 primers to form DNA-primer complexes, or (iii) a polymerization step in which the
primers in the DNA-primer complexes are extended by the polymerization

reaction,

and wherein the specific spatial temperature distribution is a temperature distribution that induces circulation of the sample by thermal convection so that the denaturation, annealing, and polymerization steps occur sequentially and repeatedly inside the sample.

In the present invention, spatial regions are generated inside the reaction vessel containing the sample, in which regions the denaturation, annealing, and polymerization steps can occur sequentially and repeatedly. In order to achieve this, a plurality of heat sources are combined to supply heat to, or remove heat from the specific regions of the sample, and moreover a relatively high temperature region is located to be lower in height than a relatively low temperature region. This results in generation of a natural thermal convection as a result of the temperature gradient between the specific regions, thereby causing circulation of the sample among the different temperature regions. Thus, the denaturation, annealing, and polymerization steps can occur sequentially and repeatedly, resulting in amplification of nucleic acid sequences.

As described, the nucleic acid sequence amplification apparatuses of the present invention are based on the thermal convection method and it has the following characteristics in their design. Firstly, the apparatus of the present invention requires a plurality of heat sources that can maintain a plurality of specific temperature regions in the sample inside the reaction vessel at selected temperatures. Secondly, a relatively high temperature region should be positioned lower in height than a relatively low temperature region so as to induce circulation of the sample among the specific temperature regions via thermal convection. More specifically, the sample in the high temperature region has a lower density than that in the low temperature region. Therefore, the buoyant force is generated and it causes the sample to move from the high temperature region at the lower position to the low temperature region at the higher position, while the gravitational force causes the sample to move in the opposite direction. A natural thermal convection is thus generated by the temperature difference, resulting in circulation of the sample among the specific temperature regions. Finally, the temperatures of the specific temperature regions should be selected such that

spatial regions, in which the denaturation, annealing, and polymerization steps can occur in each region, can be formed in the sample and also the three steps can be performed sequentially and repeatedly by thermal convection-induced circulation of the sample among the specific temperature regions at an appropriate speed.

5

The objectives, features and advantages described above will be apparent from the following detailed description provided in connection with the attached drawings. In describing the present invention, detailed explanation on the related prior art will be omitted when it can unnecessarily make the points of the present invention ambiguous. Below, the preferred embodiments according to the present invention are explained in detail referring to the attached drawings.

10

Figure 1 shows a schematic diagram of the operation principle of the nucleic acid amplification method based on the thermal convection. The embodiment shown in Figure 1 exemplifies the case in which a straight tubing with its one end closed is used as a reaction vessel and two specific temperature regions 1 and 2 are generated. However, as shown in the embodiments depicted in Figure 2, reaction vessels having modified shapes may be used and three or more specific temperature regions may be generated. It should be apparent to those skilled in the art that various modifications including those described above may be contemplated based on the thermal-convection operation principle of the nucleic acid amplification method according to the present invention.

20

In one embodiment as shown in Figure 1, the reaction vessel is in thermal contact with two heat sources 3 and 4 that supplies heat to, or removes heat from the specific regions 1 and 2 in the sample directly or indirectly through the wall of the reaction vessel, thereby forming a spatial temperature distribution in the sample. The temperature distribution thus formed allows the three steps, the denaturation, annealing, and polymerization steps required in PCR to occur. Among the two regions 1 and 2 having different temperatures, the relatively high temperature region 1 is positioned lower in height than the relatively low temperature region 2. The temperature difference generates density difference in the sample. The buoyant force exerted on the low density sample in the high temperature region 1 and the gravitational force

30

exerted on the high density sample in the low temperature region 2 generate a thermal convection of the sample. Thus the sample naturally circulates among the different spatial regions in each of which the denaturation, annealing, and polymerization steps can occur. This design makes the three PCR steps occur sequentially and repeatedly, thereby achieving amplification of DNA nucleic acid sequences by the PCR process. A more detailed operation is exemplified below.

For instance, the high temperature region 1 located at a lower portion of the sample may be maintained at a temperature between 90 to 94°C at which temperature double strand DNAs can be separated into single strand DNAs. Such arrangement makes the denaturation step occur mainly in the region 1. The low temperature region 2 located at an upper portion of the sample may be maintained at the annealing temperature between 35 to 65°C so that the DNAs denatured at the high temperature region at the lower portion moves to the low temperature region at the upper portion by thermal convection, and therefore the single stranded DNAs can anneal with the primers that are complementary to the single stranded DNAs, forming DNA-primer complexes. In this arrangement, if *Taq* DNA polymerase, known to have its optimal activity at 72°C and a wide temperature range of activity even to low temperature, is used for polymerization, the polymerization step, where DNA polymerase binds to the DNA-primer complex and the primer is extended, can occur in the low temperature region 2 and at the upper portion of the convection region 5. Therefore, the denaturation step occurs first in the high temperature region 1 and the denatured DNAs move to the low temperature region 2 by thermal convection. The annealing step thus occurs in the low temperature region in the presence of the primers. The polymerization step finally occurs in the presence of DNA polymerase during the time period that the DNA-primer complexes formed in the annealing step are passing through the low temperature region 2 and the convection region 5 by thermal convection. Consequently, the denaturation, annealing, and polymerization steps can occur sequentially and repeated, thereby amplifying efficiently the target sequences of the sample DNA.

In other embodiments as shown in Figure 2, it is contemplated that three specific regions of the reaction vessel are in thermal contact with a plurality of heat sources. Figure

2a shows a schematic diagram illustrating one embodiment in which a plurality of heat sources 3, 3', and 4 are arranged to form two high temperature regions 1 and 1' and one low temperature region 2. Figure 2b shows a schematic diagram illustrating another embodiment in which a plurality of heat sources 3, 4, and 4' are arranged to form one high temperature region 1 and two low temperature regions 2 and 2'. The plurality of the heat sources used herein may be arranged separately for each temperature region or a same heat source may be used for more than one temperature regions. In the embodiment illustrated in Figure 2a, if the two high temperature regions 1 and 1' are designed for the denaturation and polymerization steps, respectively, each region should be contacted with a heat source that can maintain the temperature of that region suitable for each step. In the embodiment illustrated in Figure 2b, if both of the two low temperature regions 2 and 2' are designed for the annealing step, it is preferable to use one heat source in replacement of the two heat sources 4 and 4'. In addition, Figure 2b shows that it is possible according to the present invention to construct a reaction vessel having separate sample inlet and outlet.

In order to improve the efficiency of the present invention, it is important to control the speed of the thermal convection such that the reaction at each step can occur sufficiently and at the same time the total reaction time can be reduced. This can be achieved by (a) controlling the temperature gradient between the specific temperature regions, (b) controlling the diameter of the reaction vessel, or (c) changing the material of the reaction vessel. When controlling the temperature gradient to adjust the thermal convection speed, it is most convenient to vary the temperature difference between the specific temperature regions. However, this has a limitation since each of the specific temperature regions has its own function for PCR that is dependent on temperature. Therefore, the distance between the high temperature region (1 and 1') and the low temperature region (2 and 2') may be varied to obtain the same effect. For instance, the temperature gradient becomes smaller as the distance between the two temperature regions becomes larger if the temperature difference remains the same, and thus the thermal convection speed becomes reduced. Since the adhesion force between the wall of the reaction vessel and the sample is a factor that inhibits the thermal convection, the thermal convection speed can be controlled by adjusting the diameter of the reaction vessel. As the ratio of the surface area of the reaction vessel in

contact with the sample relative to the volume of the sample becomes larger, the adhesion force increases and the thermal convection speed decreases. Therefore, the thermal convection speed can be controlled by adjusting the diameter of the reaction vessel, thereby controlling the surface area of the reaction vessel in contact with the sample. The adhesion force between the sample and the wall of the reaction vessel also has an intimate relation with the material of the reaction vessel. Because the PCR process is normally performed in an aqueous solution, hydrophobic materials such as polyethylene and polypropylene that have weaker adhesion force with water give rise to higher convection speeds as compared to hydrophilic materials such as glass. Therefore, the efficiency of the present invention can be improved further by designing the reaction vessel suitable for the PCR reaction kinetics based on the principles described above.

Figure 3 shows a cross sectional view (Figure 3a) and a perspective view (Figure 3b) of the nucleic acid sequence amplification apparatus according to one embodiment of the present invention. The apparatus shown in Figure 3 comprises a plurality of heat sources as means for maintaining temperature, which include a heating unit, a cooling unit, or a combination of a heating unit and a cooling unit. Preferably, an insulating means may be included in between the heat sources to thermally insulate the heat sources. In this particular embodiment, the apparatus comprises first and second heat sources that are in thermal contact with specific regions of the sample. The first heat source consists of a first thermally conductive block 101 and an electric heating unit 104 that supplies heat to the first thermally conductive block. The first thermally conductive block is in thermal contact with a lower portion of the reaction vessel to form a high temperature region at a lower portion of the sample. The second heat source consists of a second thermally conductive block 102 and a circulating water bath that circulates water at certain temperature through the inside of the second thermally conductive block to maintain the temperature of the second thermally conductive block at a suitable temperature. The second thermally conductive block 102 is in thermal contact with an upper portion of the reaction vessel to form a low temperature region at an upper portion of the sample. The second thermally conductive block 102 comprises an inlet 105 through which water flows in from the water bath, an outlet 106 through which the water flows out, and a fluid circulation channel for circulating the water inside the second

thermally conductive block. Although the fluid circulation channel in the second thermally conductive block is not depicted in Figure 3, the person skilled in the art can understand that the fluid circulation channel is designed to transfer heat uniformly to the second thermally conductive block 102. The material of the thermally conductive blocks 101 and 102 is selected to be copper that has a high thermal conductivity, and an insulator 107 is inserted between the two blocks to prohibit direct heat transfer. The first and second thermally conductive blocks 101 and 102 have receptor openings for introduction of the reaction vessels. The receptor opening consists of an opening 111 having its one end closed in the first thermally conductive block 101, a through hole 112 in the second thermally conductive block, and another through hole 117 in the insulator.

In Example 1, 2, and 3 described later, the high temperature region at a lower portion of the sample is maintained at 94°C by controlling the electric heating unit 104, and the low temperature region at an upper portion of the sample at 45°C by controlling the temperature of water in the circulating water bath.

The present invention is not limited to the nucleic acid sequence amplification apparatus depicted in Figure 3. The following modifications are possible.

Firstly, the structures of the thermally conductive blocks 101 and 102 may be modified. For instance, the first thermally conductive block 101 may be contacted thermally with a lower portion of the reaction vessel and the second thermally conductive block 102 with an upper portion of the reaction vessel, while an intermediate portion of the reaction vessel may be contacted with air or a third thermally conductive block. In addition, different from the embodiment depicted in Figure 3 in which heat is transferred from the blocks to the specific regions of the sample through the wall of the reaction vessel, the thermally conductive blocks may be contacted directly with the sample.

Secondly, the material of the thermally conductive blocks may be modified. In the embodiment depicted in Figure 3, the thermally conductive blocks 101 and 102 made of copper are used, but the material is not limited to copper. Nearly any material that can

transfer heat to the reaction vessel may be used. For instance, other thermally conductive solid or fluid such as liquid or gas may be used in replacement of the thermally conductive blocks used above. For some instance, infrared radiation or other means may be used in replacement of some or all of the thermally conductive blocks 101 and 102.

5

Thirdly, means for maintaining the temperatures of the first and second thermally conductive blocks are not limited to a circulating water bath or an electric heating unit. Nearly any unit that can supply heat to, remove heat from the sample may be used.

10 Fourthly, nearly any means such as solid, liquid, or gas may be used in replacement of the insulator 107 depicted in Figure 3 as far as it is suitable for insulating heat transfer between conductive materials. It is also possible to use a composition that does not include the insulator.

15 Finally, when a modified reaction vessel (for example, those shown in Figures 2a or 2b) is used instead of the reaction vessel illustrated in Figure 1 to facilitate the thermal convection, one may use a plurality of heat sources including thermally conductive blocks and their modifications that are suitably modified based on the principle of the present invention.

20 The first, second, and third cases described above are examples in which a part of the heat source, particularly the thermally conductive block, is modified. As used herein, the heat source refers to any means that can be used for maintaining the temperature of the sample at a specific value. Therefore, in addition to the modification examples of the heat sources described above, any device may be used as a heat source in the present invention as
25 far as it can be used to maintain a specific region of the sample at a selected temperature. The present invention includes nearly any apparatus that has a function of maintaining specific regions of the sample at selected temperatures. This is because the present invention is characterized not by a particular design of the heat sources but by the special arrangement of the heat sources intended for generating a specific temperature distribution
30 inside the sample that enables the PCR process to occur sequentially and repeatedly. More detailed designs of the modification examples described above may be varied depending on

the development of industrial technologies. Therefore, detailed explanations are omitted.

Figure 4 shows a temperature distribution measured at various heights from the bottom of the reaction vessel, demonstrating the principle of the PCR process based on the thermal convection. The thermal convection is a phenomenon by which movement of fluid is induced by a density difference generated by difference in temperature. This type of convection is referred to as a natural convection, distinguished from a forced convection where fluid is forced to move by a pump or a propeller. The term convection as used in the present invention always refers to a natural convection. For a natural convection to occur in the reaction vessel, a lower portion of the sample in the reaction vessel should be higher in temperature than an upper portion.

As can be seen in Figure 4, when the first thermally conductive block 101 contacting with a lower portion of the reaction vessel is maintained at 96°C and the second thermally conductive block 102 contacting with an upper portion at 45°C, the high temperature region (the region with the temperature higher than or equal to 90°C in Figure 4), the low temperature region (the region with the temperature near 50°C), and the convection region (the region having a temperature gradient) are formed. The sample is subject to the denaturation step in the high temperature region. The denatured sample then moves to the low temperature region across the convection region, in which the sample is subject to the annealing step. While staying in the low temperature region and moving back through the convection region from the low temperature region, the sample is subject to the polymerization step. Thermal convection causes the sample to circulate the three regions sequentially and repeatedly, thereby leading to amplification of nucleic acid sequences by PCR.

Figure 7 shows the results obtained by using DNA polymerase immobilized on the solid surface. In the nucleic acid sequence amplification method of the thermal convection type according to the present invention, DNA polymerases that are not thermostable, such as *Klenow* fragment and T7 DNA polymerase, may be used in addition to the thermostable polymerases such as *Taq* DNA polymerase. This is due to the following fact. By the virtue

of the characteristics of the present invention, the temperature of the total sample does not change from a high temperature to a low temperature or vice versa repeatedly, but the specific regions in the sample are maintained at constant temperatures. For instance, an upper portion of the sample may be maintained at a low temperature, whereas a lower portion of the sample may be maintained at a high temperature. It is possible to use DNA polymerase that is not thermostable, by locating the immobilized DNA polymerase in the low temperature region or in the upper portion of the convection region near the low temperature region.

Example 1, 2, and 3 described below confirm that the objectives of the present invention can be achieved using a nucleic acid sequence amplification apparatus of the present invention.

Example 1.

1. Experimental conditions

1.1. Reaction vessel

A glass tubing with its one end closed was used as a reaction vessel. The glass tubing had a length of 55~60 mm, an inner diameter of 2 mm, an outer diameter of 8 mm, and a thickness of 3 mm at the bottom-side closed end. The inner wall of the glass tubing was coated with polytetrafluoroethylene using a spray type coating material and thermally hardened.

1.2. Sample

pBluescript II KS(+) was used as a template DNA. The sample used in PCR contained 40 ng of the template DNA, 40 pmol each of T3 primer (5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3') and T7 primer (5'-AATACGACTCACTATAG-3'), 4 nmol of dNTP, 1 pmol (5 U) of *Taq* DNA polymerase, and 250 nmol of $MgCl_2$ in 100 μ l of 10 mM Tris buffer at pH 8.3 containing 50 mM KCl.

1.3. Reaction temperature and reaction time

Firstly, the first thermally conductive block 101 located at a lower side was heated with an electric heating unit and maintained at 96°C, and the second thermally conductive block 102 located at an upper side was maintained at 45°C using a circulating water bath. The sample prepared above was injected to the reaction vessel, and the reaction vessel was then inserted into the receptor 111, 117, and 112. The sample was allowed to react for a suitable time. During the reaction, the reaction vessel was pressurized to about 1.2 atm by adding nitrogen gas to prevent boiling of the sample solution.

1.4. Measurement of the temperature distribution in the sample contained in the reaction vessel

The temperature in each region of the sample was measured under the above reaction conditions. The tip of a thermocouple thermometer was placed every 2.5 mm from the bottom of the reaction vessel, and the temperature was measured and recorded after sufficient time. An example of the temperature distribution of the sample in the reaction vessel is shown in Figure 4.

2. Results

First, the measured temperature in each region of the sample in the reaction vessel under the above reaction conditions confirmed (see Figure 4) that a high temperature region above 90°C for denaturation, a low temperature region around 50°C for annealing, and a convection region having a temperature gradient for induction of the thermal convection are formed. Polymerization is expected to occur in the low temperature region and the upper portion of the convection region.

After the sample was incubated for a given reaction time under the above reaction conditions, the reaction vessel was taken out and cooled. The reaction products were analyzed by electrophoresis using 1.0% agarose gel. Figure 5 is a photograph of the electrophoresis results obtained at the reaction times up to 4 hours for every 30 min time interval. The reaction product is a 164 bp double stranded DNA. As can be seen in Figure 5, the PCR reaction reaches saturation before 90 min.

Example 2.

1. Experimental conditions

In addition to T3/T7 primer pair, KS/U , KS/*Pvu*II, and KS/*Nae*I primer pairs were also examined in the experiments. The reaction time was set to 150 min, and other reaction conditions were the same as in Example 1. The sequences of the T3 and T7 primers were described in Example 1, and the sequences of other primers are given as follows:

KS primer: 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3'

U primer: 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

*Pvu*II primer: 5'-TGGCGAAAGGGGGATGT-3'

*Nae*I primer: 5'-GGCGAACGTGGCGAGAA-3'

2. Results

As in Example 1, the reaction products were analyzed by electrophoresis. Figure 6 is a photograph of the electrophoresis results of Example 2, where lanes 1, 2, 3, and 4 are the results obtained with T3/T7, KS/U, KS/*Pvu*II, and KS/*Nae*I primer pairs, respectively. It can be seen that the four primer pairs produced double stranded DNAs with correct sizes of 164 bp, 144 bp, 213 bp, and 413 bp, respectively.

Example 3.

1. Experimental conditions

Instead of adding *Taq* DNA polymerase to the sample, *Taq* DNA polymerase was immobilized on the surface of a Au wire and it was located in the low temperature region. Other experimental conditions were the same as in Example 1.

2. Results

As in Example 1, the reaction products were analyzed by electrophoresis. Figure 7 is a photograph of the electrophoresis results obtained at the reaction times up to 4 hours for every 30 min time interval. As can be seen in Figure 7, the PCR reaction reaches saturation before

150 minutes.

From the results of Example 1, 2, and 3, the following points can be seen.

5 Firstly, the nucleic acid sequence amplification apparatus based on the thermal convection according to the present invention works efficiently.

Secondly, it was confirmed that the PCR process can be performed by locating the DNA polymerase immobilized on a solid surface in the low temperature region or in the upper
10 portion of the convection region by using the nucleic acid sequence amplification apparatus based on the thermal convection according to the present invention. It was thus confirmed that DNA polymerases that are not stable at high temperature can also be used.

It should be apparent to those skilled in the art that the present invention described
15 above is not limited to the above embodiments and the attached drawings and that various substitutions, changes, and modifications are possible without departing from the technical ideas of the present invention. Therefore, the above embodiments and modifications are only for illustration, and should not be interpreted to be limiting the present invention. The real scope of the present invention should be determined by the following claims and is not
20 restricted in any way by the specification.

USEFULNESS OF THE INVENTION

As described above, in the present invention, a plurality of specific regions of the
25 sample are maintained at specific temperatures, and thermal convection among the specific regions makes the sample circulate inside the reaction vessel. Thus, the denaturation, annealing, and polymerization steps can be performed sequentially and repeatedly. Therefore, the following effects can be noted.

30 Firstly, the nucleic acid sequence amplification apparatus can be designed with a simple composition. The present invention does not require the process for changing the

temperature of the sample. Therefore, the design according to the present invention can be made simpler because complex devices included in the prior apparatuses for changing and controlling the sample temperature are not required.

5 Secondly, the apparatus according to the present invention can be readily miniaturized or integrated into a complex apparatus such as Lab-on-a-chip to perform the PCR nucleic acid sequence amplification process. It can also be incorporated into the apparatuses in which temperature change is not desirable.

10 Thirdly, DNA polymerases that are not thermostable can also be used. This is because immobilized DNA polymerases can be used in the present invention by locating them in a specific region inside the reaction vessel which region is maintained at a temperature suitable for the polymerase activity. According to the present invention, when an immobilized DNA polymerase is used, PCR can be performed with the immobilized DNA polymerase
15 maintained at the temperature where the polymerase is active. Therefore, according to the present invention, enzymes having their optimal activities at low temperature, such as Klenow fragment or T7 DNA polymerase, may also be used for the PCR process.

20 Finally, the reaction time for PCR can be reduced. In the present invention, there is no need to change the temperature of the total sample. Thus the time needed for changing and controlling the temperature of the whole sample can be saved.

What is claimed is:

1. A nucleic acid sequence amplification method using polymerase chain reaction (PCR), which method comprises:

5 a step of injecting into a reaction vessel a sample containing a template DNA having target nucleic acid sequences to be amplified, DNA polymerase, deoxyadenosine triphosphate, deoxycytidine triphosphate, deoxyguanosine triphosphate, deoxythymidine triphosphate, and at least two oligonucleotide primers complementary to the 3' terminus of each of the target nucleic acid sequences; and

10 a step of maintaining a specific spatial temperature distribution in the sample by contacting thermally with the sample a plurality of heat sources which supply heat to, or remove heat from specific regions of the sample such that a relatively high temperature region is located lower in height than a relatively low temperature region,

15 wherein the specific spatial temperature distribution comprises spatial regions fulfilling temperature conditions suitable for (i) a denaturation step in which double stranded DNAs become separated to single stranded DNAs, (ii) an annealing step in which the single stranded DNAs formed in the denaturation step hybridize to the primers to form DNA-primer complexes, or (iii) a polymerization step in which the
20 primers in the DNA-primer complexes are extended by the polymerization reaction,

and wherein the specific spatial temperature distribution is a temperature distribution that induces circulation of the sample by thermal convection so that the denaturation, annealing, and polymerization steps occur sequentially and
25 repeatedly inside the sample.

2. The nucleic acid sequence amplification method of claim 1, wherein at least one of the heat sources comprises a thermally conductive solid in thermal contact with a specific region of the reaction vessel or the sample; and a heating unit that supplies heat to the thermally
30 conductive solid, a cooling unit that removes heat from the thermally conductive solid, or a combination of the heating unit and the cooling unit.

3. The nucleic acid sequence amplification method of claim 1, wherein at least one of the heat sources comprises a liquid in thermal contact with a specific region of the reaction vessel; a receptor in which the liquid is to be contained; and a heating unit that supplies heat to the liquid, a cooling unit that removes heat from the liquid, or a combination of the heating unit and the cooling unit.

4. The nucleic acid sequence amplification method of claim 3, wherein at least one of the heat sources further comprises a circulation unit that circulates the liquid around the reaction vessel.

5. The nucleic acid sequence amplification method of claim 1, wherein at least one of the heat sources comprises a gas in thermal contact with a specific region of the reaction vessel; a heating unit that supplies heat to the gas, a cooling unit that removes heat from the gas, or a combination of the heating unit and the cooling unit; and a circulation unit that circulates the gas around the reaction vessel.

6. The nucleic acid sequence amplification method of claim 1, wherein at least one of the heat sources is an infrared radiation generating unit that supplies heat directly to the sample.

7. The nucleic acid sequence amplification method of claim 1, which method uses a means for insulating heat transfer between the heating sources.

8. A nucleic acid sequence amplification apparatus using PCR, which apparatus comprises:
a plurality of heat sources which may supply heat to, or remove heat from a plurality of specific regions in a sample,
wherein the heat sources are arranged to maintain a specific spatial temperature distribution in the sample such that a relatively high temperature region is located lower in height than a relatively low temperature region,
wherein the specific spatial temperature distribution comprises spatial regions fulfilling temperature conditions suitable for (i) a denaturation step in which double

strand DNAs become separated to single strand DNAs, (ii) an annealing step in which the single strand DNAs formed in the denaturation step hybridize to the primers to form DNA-primer complexes, or (iii) a polymerization step in which the primers in the DNA-primer complexes are extended by the polymerization reaction,

and wherein the specific spatial temperature distribution is a temperature distribution that induces circulation of the sample by thermal convection so that the denaturation, annealing, and polymerization steps occur sequentially and repeatedly inside the sample.

9. The nucleic acid sequence amplification apparatus of claim 8, wherein at least one of the heat sources comprises a thermally conductive solid in thermal contact with a specific region of the reaction vessel or the sample; and a heating unit that supplies heat to the thermally conductive solid, a cooling unit that removes heat from the thermally conductive solid, or a combination of the heating unit and the cooling unit.

10. The nucleic acid sequence amplification apparatus of claim 8, wherein at least one of the heat source comprises a liquid in thermal contact with a specific region of the reaction vessel; a receptor in which the liquid is to be contained; and a heating unit that supplies heat to the liquid, a cooling unit that removes heat from the liquid, or a combination of the heating unit and the cooling unit.

11. The nucleic acid sequence amplification apparatus of claim 10, wherein at least one of the heat sources further comprises a circulation unit that circulates the liquid around the reaction vessel.

12. The nucleic acid sequence amplification apparatus of claim 8, wherein at least one of the heat sources comprises a gas in thermal contact with a specific region of the reaction vessel; a heating unit that supplies heat to the gas, a cooling unit that removes heat from the gas, or a combination of the heating unit and the cooling unit; and a circulation unit that circulates the gas around the reaction vessel.

13. The nucleic acid sequence amplification apparatus of claim 8, wherein at least one of the heat sources is an infrared radiation generating unit that supplies heat directly to the sample.
- 5 14. The nucleic acid sequence amplification apparatus of claim 8, which apparatus uses a means for insulating heat transfer between the heating sources.

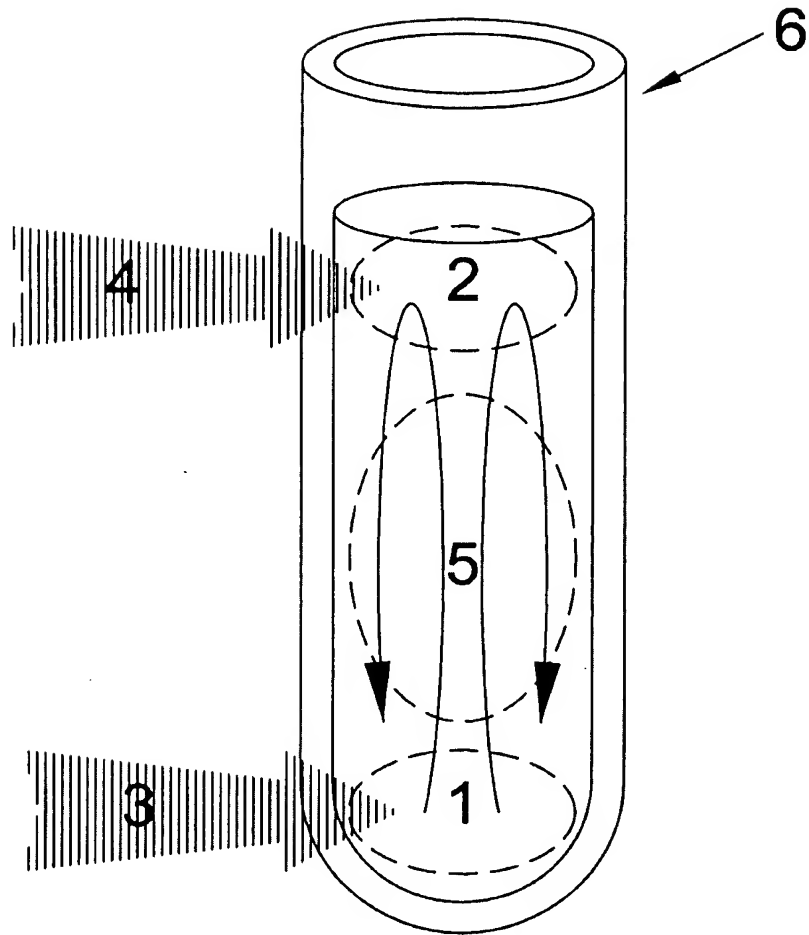


Fig. 1

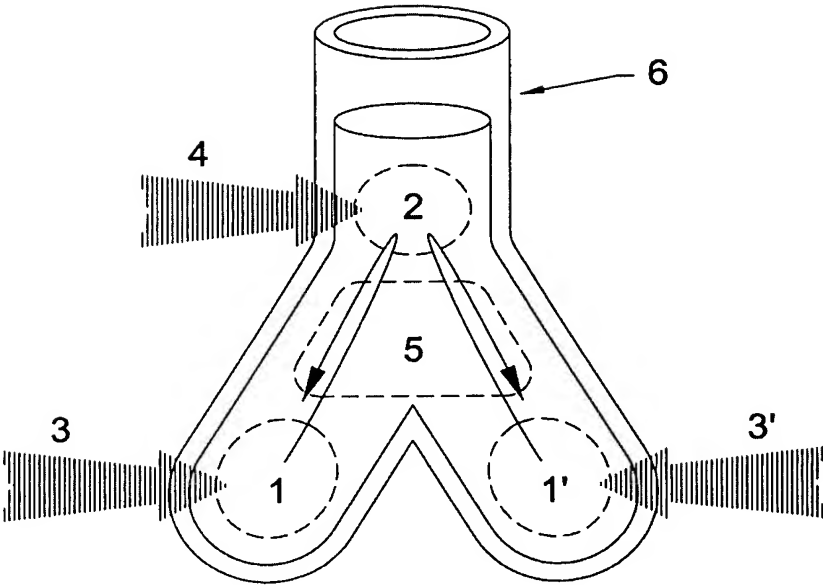


Fig. 2a

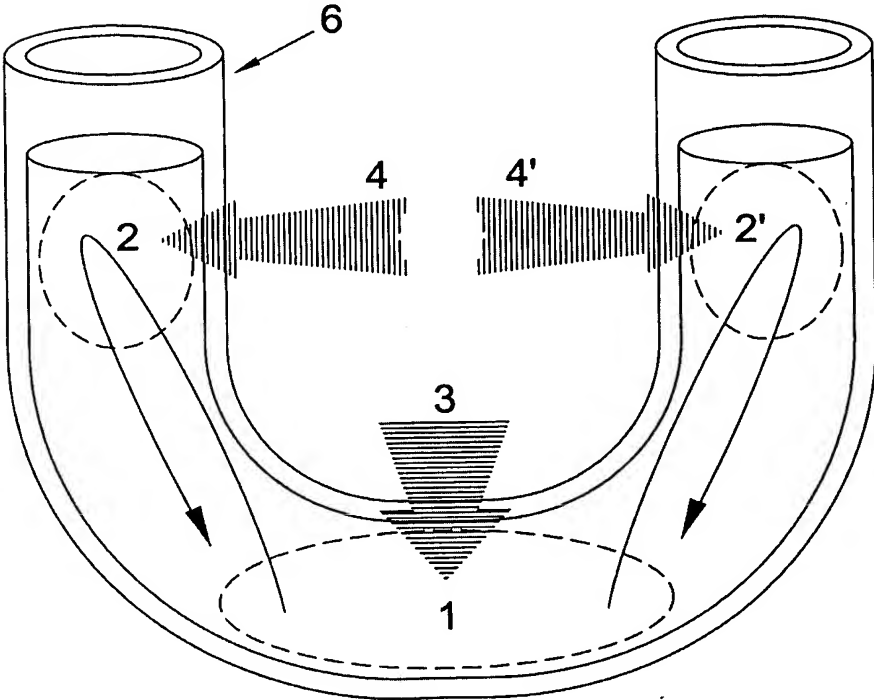


Fig. 2b

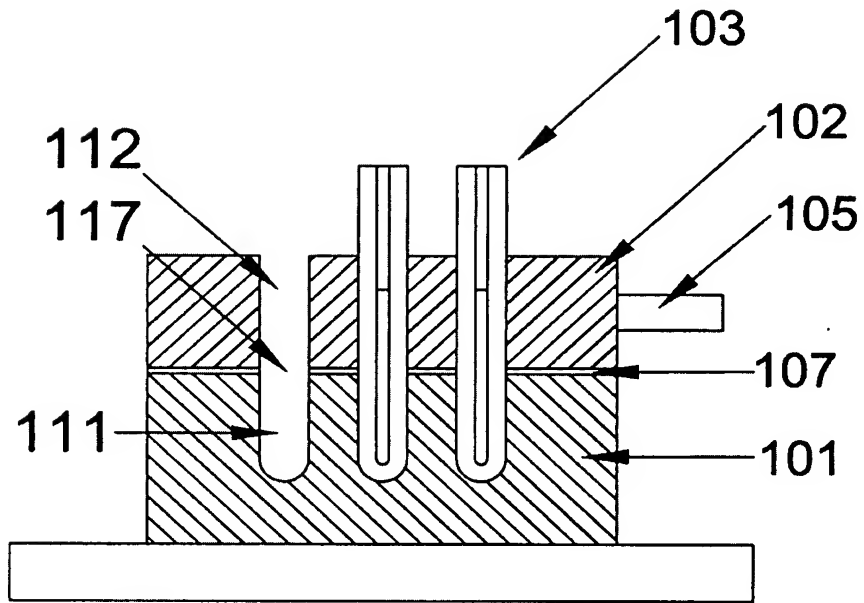


Fig. 3a

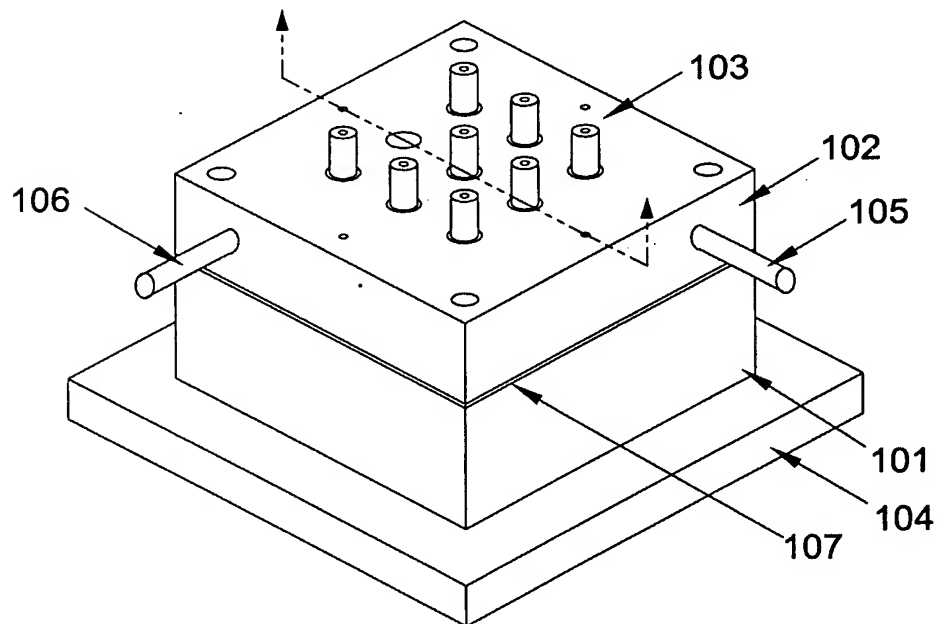


Fig. 3b

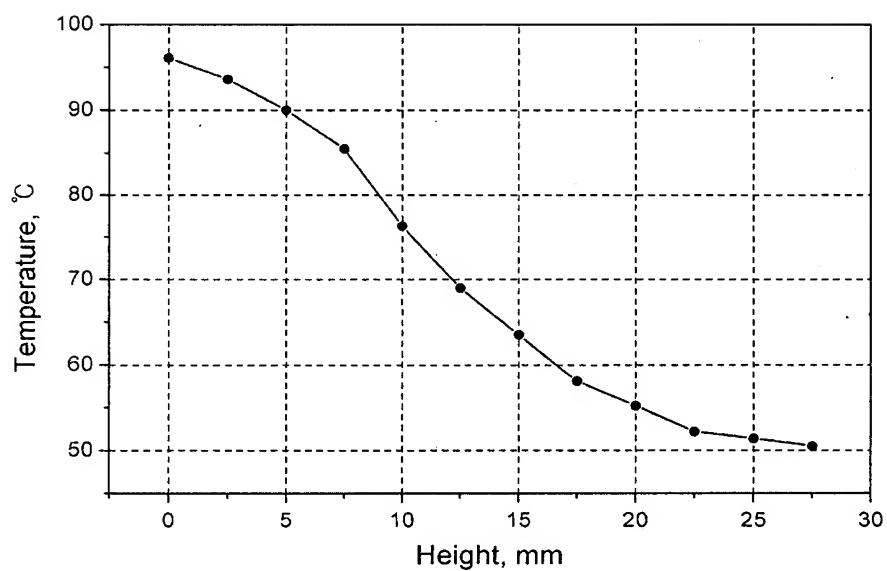


Fig. 4

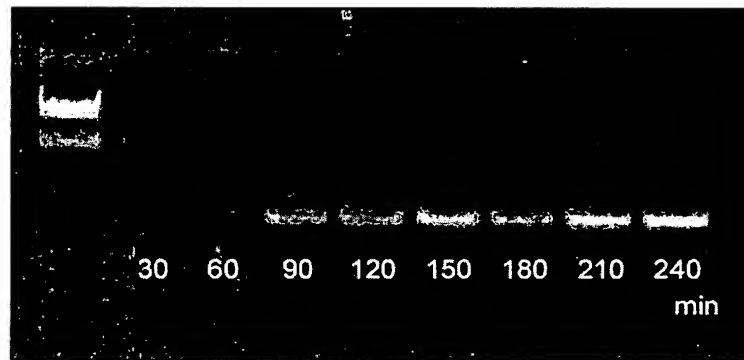


Fig. 5

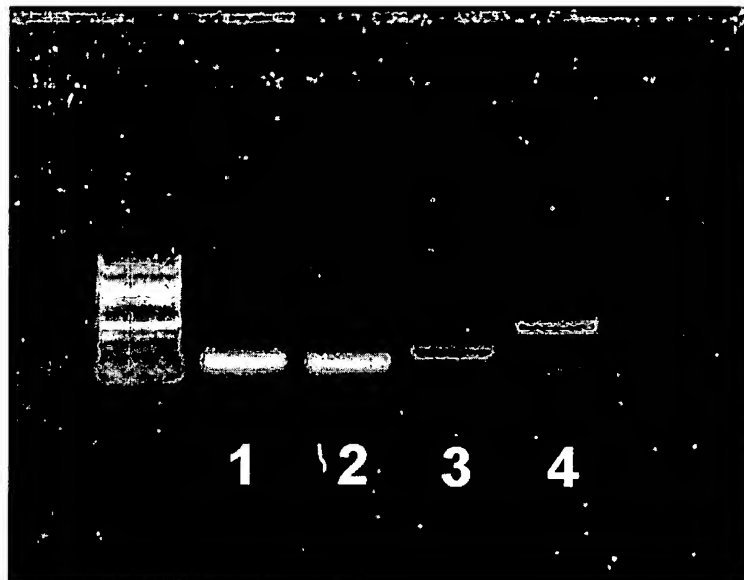


Fig. 6

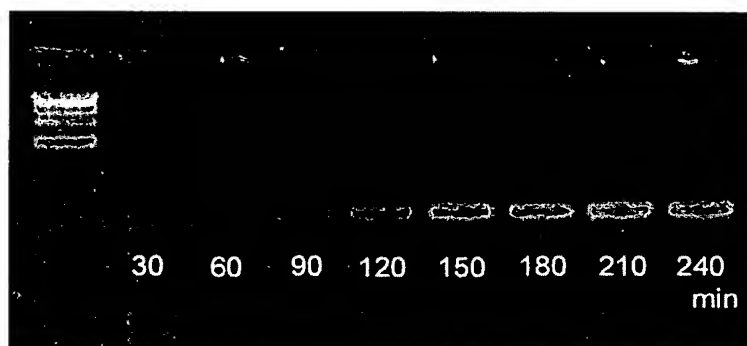
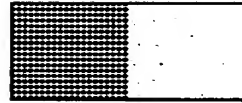


Fig. 7



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2001-0057040
Application Number

출원년월일 : 2001년 09월 15일
Date of Application SEP 15, 2001

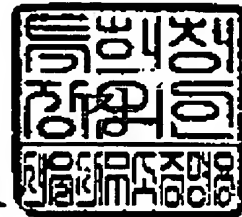
출원인 : 아람 바이오시스템 주식회사
Applicant(s) AHRAM BIOSYSTEMS INC.



2006년 12월 28일

특허청

COMMISSIONER



◆ This certificate was issued by Korean Intellectual Property Office. Please confirm any forgery or alteration of the contents by an issue number or a barcode of the document below through the KIPOnet- Online Issue of the Certificates' menu of Korean Intellectual Property Office homepage (www.kipo.go.kr). But please notice that the confirmation by the issue number is available only for 90 days.

【서지사항】

【서류명】 명세서 등 보정서
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2001.09.17
【제출인】
【명칭】 아람 바이오시스템 주식회사
【출원인코드】 1-2001-029413-9
【사건과의 관계】 출원인
【대리인】
【성명】 김동진
【대리인코드】 9-2001-000322-5
【사건의 표시】
【출원번호】 10-2001-0057040
【출원일자】 2001.09.15
【심사청구일자】 2001.09.15
【발명의 명칭】 열 대류를 이용한 열기서열 증폭 방법 및 장치
【제출원인】
【접수번호】 1-1-01-0237001-64
【접수일자】 2001.09.15
【보정할 서류】 명세서등
【보정할 사항】
【보정대상항목】 별지와 같음
【보정방법】 별지와 같음
【보정내용】 별지와 같음
【취지】 특허법시행규칙 제13조 실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위
와 같 이 제출합니다.

대리인

김동진 (인)

【수수료】**【보정료】** 0 원**【추가심사청구료】** 0 원**【기타 수수료】** 0 원**【합계】** 0 원**【첨부서류】** 1.보정내용을 증명하는 서류_1통[명세서 중 일부(제1도, 제2도, 제3 도, 제4도, 제5도, 제6도, 제7도)]

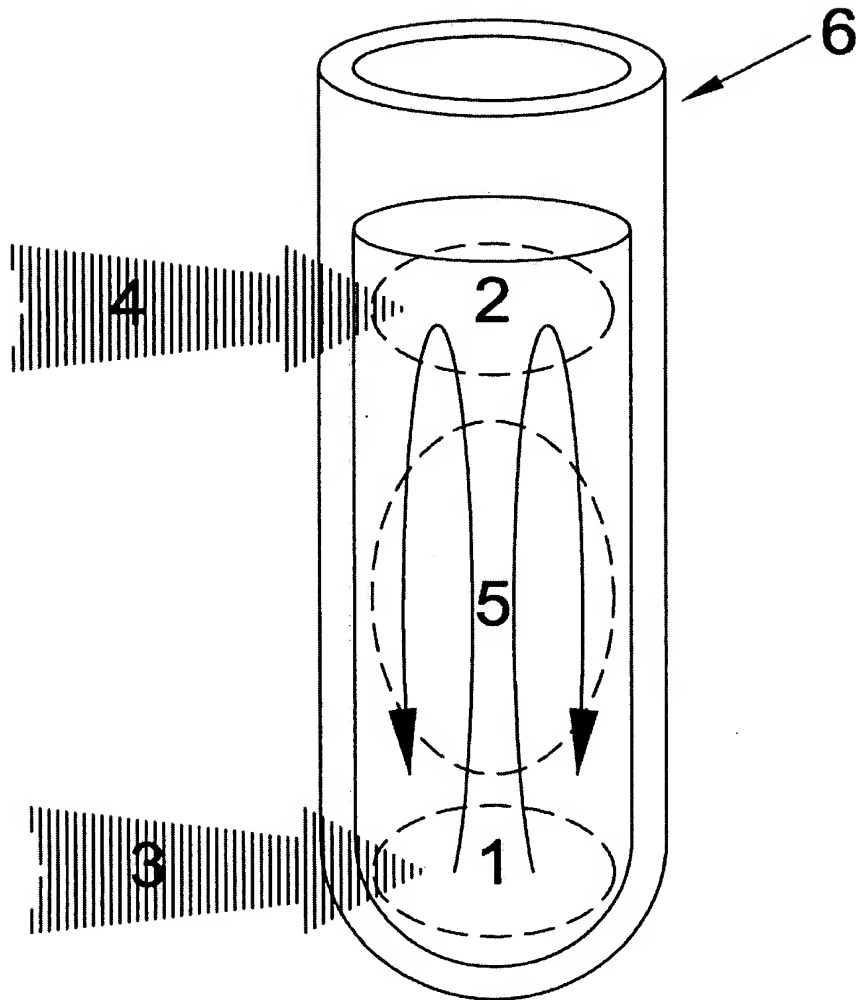
【보정서】

【보정대상항목】 도 1

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 1】

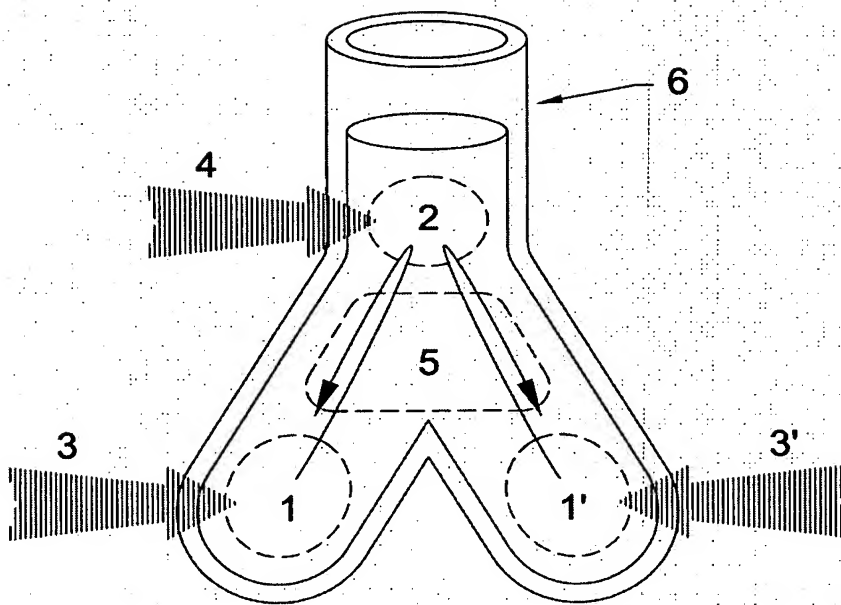


【보정대상항목】 도 2a

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 2a】

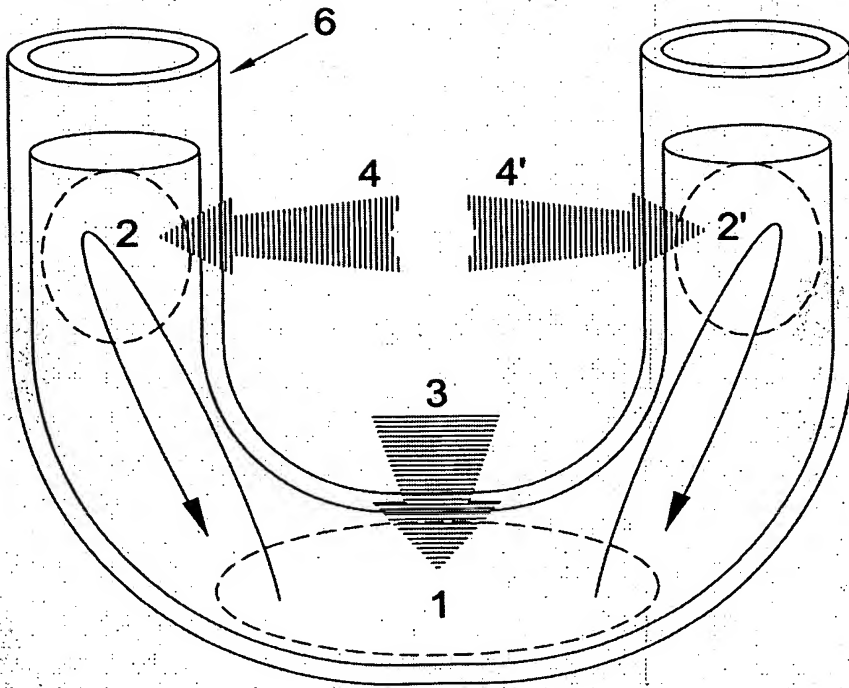


【보정대상항목】 도 2b

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 2b】

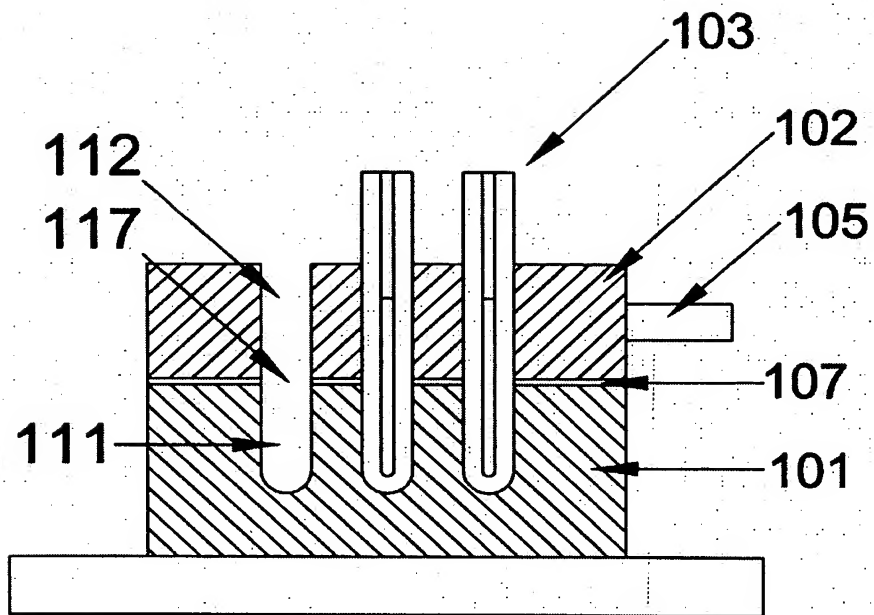


【보정대상항목】 도 3a

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 3a】

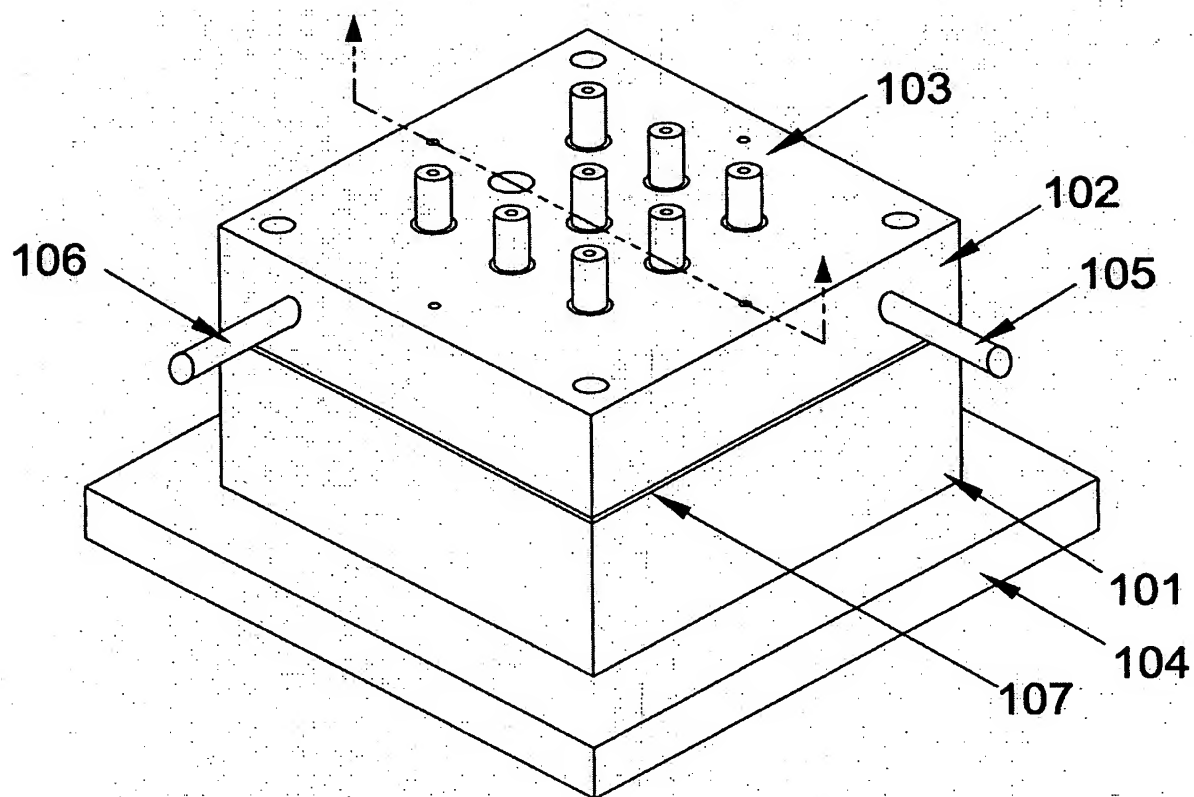


【보정대상항목】 도 3b

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 3b】

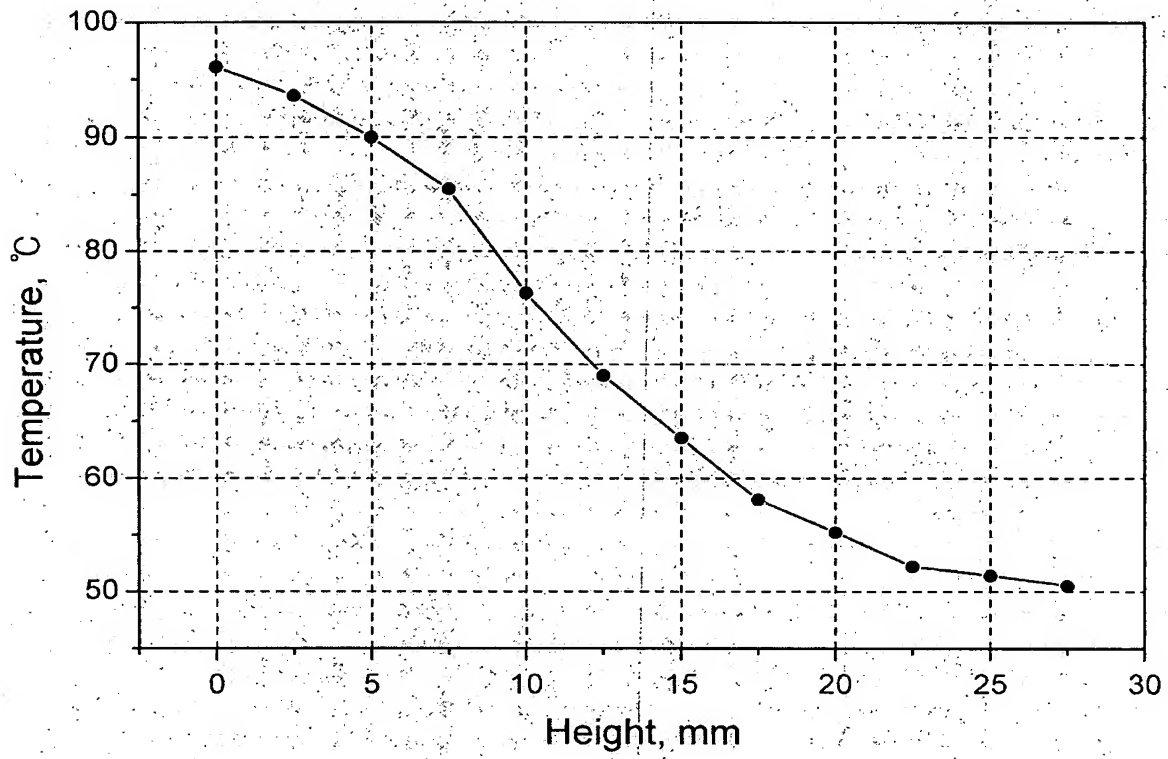


【보정대상항목】 도 4

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 4】

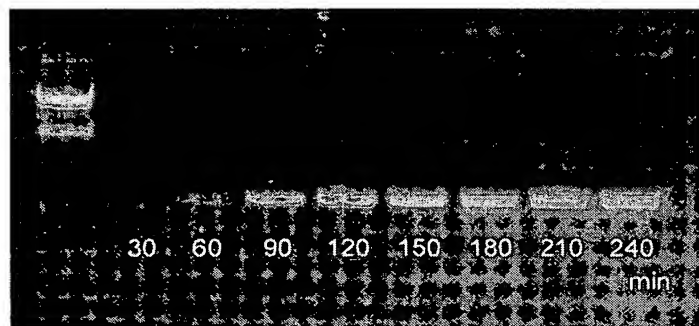


【보정대상항목】 도 5

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 5】

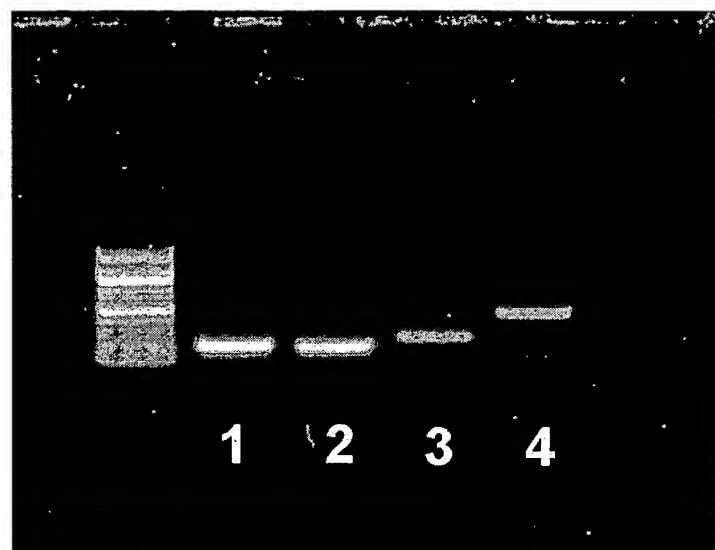


【보정대상항목】 도 6

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 6】

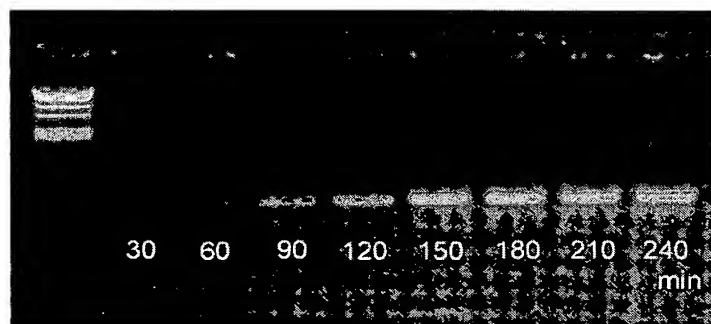


【보정대상항목】 도 7

【보정방법】 정정

【보정내용】

【도 7】



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0001
【제출일자】	2001.09.15
【국제특허분류】	C12M
【발명의 국문명칭】	열 대류를 이용한 염기서열 증폭 방법 및 장치
【발명의 영문명칭】	METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES BY USING THERMAL CONVECTION
【출원인】	
【명칭】	아람 바이오시스템 주식회사
【출원인코드】	1-2001-029413-9
【대리인】	
【성명】	김동진
【대리인코드】	9-2001-000322-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	황현진
【성명의 영문표기】	HWANG, Hyun Jin
【주민등록번호】	610112-1XXXXXXX
【우편번호】	143-210
【주소】	서울특별시 광진구 광장동 577 현대 파크빌 1012-1601
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김정희
【성명의 영문표기】	KIM, Jeong Hee
【주민등록번호】	620121-2XXXXXXX
【우편번호】	143-210

【주소】 서울특별시 광진구 광장동 577 현대 파크빌 1012-1601
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 정경훈
【성명의 영문표기】 JEONG, Kyunghoon
【주민등록번호】 730204-1XXXXXXX
【우편번호】 503-062
【주소】 광주광역시 남구 봉선2동 490-5
【국적】 KR
【심사청구】 청구
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다.

대리인

김동진 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20 면	29,000 원
【가산출원료】	19 면	19,000 원
【우선권주장료】	0 건	0 원
【심사청구료】	14 항	557,000 원
【합계】		605,000 원
【감면사유】	소기업(70%감면)	
【감면후 수수료】	181,500 원	
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 위임장_1통 3. 소기업임을 증명하는 서류_1통	

【요약서】

【요약】

본 발명은 구성이 간단하고, 소형화 및 복합장치에서의 구현이 용이하고, 고온 안정성이 아닌 DNA 중합효소도 사용할 수 있는 열 대류를 이용한 염기서열 증폭 장치 및 방법을 제공한다. 본 발명은 상기 시료 내의 복수의 특정 영역에 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열원을 열적으로 결합시키되, 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 상기 열원을 배치시킴으로써, 중합효소 연쇄반응이 효율적으로 일어날 수 있는 특정의 공간적 온도 분포를 시료 내에 유지시키는 단계를 포함한다.

【대표도】

도 3a

【색인어】

염기서열 증폭 방법, 중합효소 연쇄반응, 열 대류, 열원, 전도성 고체

【명세서】

【발명의 명칭】

열 대류를 이용한 염기서열 증폭 방법 및 장치 {METHOD AND APPARATUS FOR AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACID SEQUENCES BY USING THERMAL CONVECTION}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도1은 본 발명에 따른 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법의 작동원리를 보여 주는 모식도,
- <2> 도2a 및 도2b는 시료 내에 세 개 이상의 특정 온도 영역을 형성하는 경우의 모식도,
- <3> 도3a 및 도3b는 본 발명에 따른 염기서열 증폭 장치의 단면도와 사시도,
- <4> 도4는 높이에 따른 반응용기 내 시료의 온도 분포도,
- <5> 도5는 실험 1의 결과를 반응시간에 따라서 보여주는 전기 영동사진,
- <6> 도6은 실험 2의 결과를 프라이머 쌍별로 보여주는 전기 영동사진,
- <7> 도7은 실험 3의 결과를 반응시간에 따라서 보여주는 전기 영동사진이다.
- <8> <도면의 주요 부분에 대한 부호의 설명>
- <9> 1, 1': 고온 영역
- <10> 2, 2': 저온 영역

- <11> 3, 4, 3', 4': 열원
- <12> 5: 대류 영역
- <13> 6: 반응용기
- <14> 101: 제 1 전도성 블록
- <15> 102: 제 2 전도성 블록
- <16> 103: 반응용기
- <17> 104: 가열장치
- <18> 105: 온도 조절 유체 유입부
- <19> 106: 온도 조절 유체 유출부
- <20> 107: 단열재
- <21> 112, 117: 관통구
- <22> 111: 개구부

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <23> 본 발명은, 염기서열(nucleic acid sequences)을 증폭하는 장치 및 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 열 대류를 이용하여 염기서열을 증폭하는 장치 및 방법에 관한 것으로, 온도 조절에 의하여 DNA 또는 RNA와 같은 유전자 시료의 특정

부위 염기서열을 증폭하는 공정들, 즉 중합효소 연쇄반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 포함한 염기서열 증폭 공정들을 실행할 수 있는 방법 및 장치에 관한 것이다.

<24> 염기서열 증폭기술은 생명과학, 유전공학, 및 의학 분야 등의 연구 개발 및 진단 목적으로 광범위하게 활용되고 있으며, 특히 중합효소 연쇄반응에 의한 염기서열 증폭기술(이하 "PCR 염기서열 증폭기술"이라 한다)이 널리 활용되고 있다. 상기 PCR 염기서열 증폭기술에 관한 상세한 내용은, 미합중국 특허 제4,683,202호, 제4,683,195호, 제4,800,159호, 및 제4,965,188호에 기재되어 있다.

<25> PCR 염기서열 증폭기술을 자동화하여 여러 종류의 유전자 시료들을 보다 효율적으로 빠른 시간 안에 증폭하기 위한 다양한 장치 및 방법들이 개발되어 사용되고 있는데, 그 기본적인 작동원리는 다음과 같다.

<26> 상용화된 PCR 염기서열 증폭기술에서는, 증폭될 주형 DNA(template DNA), 주형 DNA의 각 단일가닥의 특정 서열과 상보적인 서열을 가지는 올리고뉴클레오티드(oligonucleotide) 프라이머(primer) 쌍, 고온 안정성 DNA 중합효소(thermostable DNA polymerase), 및 dNTP(deoxynucleotide triphosphates)를 포함한 시료를 준비하고, 이 시료의 온도를 순차적으로 변화시키는 온도 사이클을 반복함으로써 주형

DNA의 특정 부위 염기서열을 증폭한다. 구체적으로 3단계 또는 2단계의 온도 순환 사이클을 사용하는데, 온도 변화에 의하여 염기서열 증폭을 달성하는 과정은 다음과 같다.

<27> 첫 번째 단계는 디내츄레이션 단계(denaturation step)로서, 상기 시료를 고온으로 가열시킴으로써 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리하는 단계이다. 두 번째 단계는 어닐링 단계(annealing step)로서, 상기 디내츄레이션 단계를 거친 시료를 적정 온도로 냉각시킴으로써, 상기 단일가닥 DNA와 상기 프라이머가 이중나선 결합을 하여 부분적으로 이중 가닥이 된 DNA-프라이머 복합체(DNA-primer complex)를 형성하는 단계이다. 세 번째 단계는 폴리머리제이션 단계(polymerization step)로서, 상기 어닐링 단계를 거친 시료를 적정 온도로 유지시킴으로써 상기 DNA-프라이머 복합체의 프라이머를 DNA 중합효소가 중합반응에 의해 연장(extension)하여 원래의 주형 DNA에 대하여 상보적인 서열을 가지는 새로운 단일가닥 DNA를 복제하는 단계이다. 이와 같은 세 가지 단계를 순차적으로 20 내지 40 회 정도 반복하여 매 사이클마다 상기 두 개의 프라이머 사이의 염기서열이 복제되게 함으로써 수백만 배 또는 그 이상에 이르는 염기서열 증폭을 달성하게 된다.

<28> 상기 디내츄레이션 단계에서의 온도는 90℃에서 94℃ 범위의 값을 주로 사용하며, 상기 어닐링 단계에서의 온도는 사용된 프라이머의 녹는 점, 즉 T_m 값에 따라 적절하게 조절하는데, 통상적으로 35℃에서 65℃ 범위의 값을 사용한다. 폴리머리제이션 단계에서의 온도는 주로 사용하는 *Thermus aquaticus*로부터 추출한 고온

안정성 *Taq* DNA 중합효소의 최적 활성 온도인 72℃로 맞추어, 3단계 온도 순환 사이클을 사용하는 것이 가장 보편적이며, *Taq* DNA 중합효소의 활성 온도 범위가 상당히 넓으므로 상기 어닐링 단계와 폴리머리제이션 단계의 온도를 같게 하여 온도를 순환하는 2단계 온도 사이클도 사용하고 있다.

<29> 종래에 가장 보편적으로 많이 사용하는 방식은 반응용기를 열전도성이 높은 금속 고체블록과 열적으로 접촉시킨 상태에서, 상기 금속 고체블록을 가열장치 및 냉각장치와 결합시켜 온도를 변화시킴으로써 시료의 온도 순환 사이클을 달성하는 방식이다. 이러한 방식의 상용화된 장치로 온도 변화 시간을 단축시키기 위하여 열전도성이 아주 높은 금도금이 된 은 블록(Gold-plated silver block)을 사용하거나, 펠타이어(Peltier) 냉각법을 채용한 제품 등이 상용화되어 시판되고 있다. 최근 들어 금속 고체블록을 열원으로 사용하는 대신, 기체 또는 액체와 같은 유체를 열원으로 대체하여, 적정 온도로 가열된 유체를 시료가 들어 있는 반응용기와 효율적으로 접촉할 수 있게 순환시켜 온도 변화 시간을 상당히 단축할 수 있는 기술들이 개발되어 제품화되고 있다. 또한, 시료가 들어 있는 반응용기 또는 시료 자체를 특정 온도로 유지된 열원들과 순차적으로 접촉하게 이동시키는 방식, 적외선을 사용하여 시료를 직접 가열하는 방식 등 시료의 온도 변화 사이클을 효율적으로 짧은 시간 안에 달성하기 위한 다양한 방법들이 개발되고 있다.

<30> 상기 종래의 염기서열 증폭 장치는, 시료 전체의 온도를 3단계 또는 2단계

온도 순환 사이클에 따라 변화시키므로 다음과 같은 문제점이 존재한다.

<31>

첫째, 종래의 온도 사이클형 염기서열 증폭 장치는 시료의 온도를 바꾸는 공정이 반드시 필요하므로 구성이 복잡하다. 시료 전체의 온도를 바꾸는 공정을 수행하기 위해서, 상기 금속 고체블록 또는 유체와 같은 열원의 온도를 변화시키는 방식은 열원의 온도를 조절하여 빠르고 고르게 변화시키는 수단과 온도변화의 간격을 조절하는 수단이 반드시 필요하며, 상기 반응용기 또는 시료를 특정 온도의 열원과 순차적으로 접촉하게 이동시키는 방식은 반응용기 또는 시료를 빠르고 정확하게 이동시키는 수단과 이동시간을 조절하는 수단이 반드시 필요하기 때문이다.

<32>

둘째, 종래의 염기서열 증폭 장치는 이러한 복잡한 구성으로 인하여 복잡장치 및 소형화된 소자에 구현하는 것이 쉽지 않다. 최근의 생명공학에서는, 포토리소그래피 (photolithography)를 사용하여 유리, 실리콘, 또는 고분자 기판 위에 시료가 이동하는 채널을 비롯하여 밸브, 압력계, 반응용기, 검출장치 등을 하나의 장치로 집적시킨 랩온어칩(Lab-on-a-chip)과 같은 소형화된 복합장치들을 개발하고 있으며, 이러한 소형화 또는 복합화된 장치들은 연구용 및 의학적 목적의 다양한 활용도를 가질 것으로 기대되고 있다. 염기서열 증폭반응을 수행하는 장치를 이와 같은 소형화된 칩 상에서 구현하는 경우, 시료 전체의 온도를 변화시키는 공정을 반드시 필요로 하는 종래의 염기서열 증폭 방식은 그 구성상의 복잡성으로 인하여 소형화에 불리한 방식이며, 또한 급격한 온도 변화가 바람직하지 않은 복합장치에

서의 구현도 어렵다.

<33> 셋째, 종래의 염기서열 증폭 장치는 *Taq* DNA 중합효소와 같은 고온 안정성을 가진 DNA 중합효소만을 사용할 수 있다. 종래의 염기서열 증폭 장치는 시료 전체를 고온으로 바꾸는 공정을 포함하고 있기 때문이다.

<34> 넷째, 종래의 염기서열 증폭 장치는 PCR 반응시간을 단축시키는데 한계가 있다. 종래의 염기서열 증폭 장치는 시료 전체의 온도를 바꾸기 위한 공정이 반드시 필요하기 때문에 적어도 온도가 변화되는 시간만큼 PCR 반응시간이 늘어나게 된다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<35> 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해서 안출된 것으로서, 시료 내에 서로 온도가 다른 복수의 특정 온도의 영역을 형성시키고 상기 복수의 특정 온도의 영역간의 온도 기울기로부터 기인하는 자연적인 열 대류 현상에 의해 각 온도 영역간의 시료의 순환이 일어나게 함으로써 염기서열 증폭을 달성하는, 새로운 개념의 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

<36> 본 발명은 종래의 온도 순환 사이클 방식에서 반드시 필요한 온도 변화를 조

절하여 일으키는 수단과 온도 변화의 간격을 조절하는 수단 등의 복잡한 구성 요소를 필요로 하지 않는, 보다 구성적으로 간단한 열 대류 방식의 염기서열 증폭방법 및 장치를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

<37> 따라서, 본 발명은 종래의 장치 및 방법에 비하여 구성적으로 간단한 염기서열 증폭장치 및 방법을 개발함으로써 장치의 소형화 및 랩온어칩과 같은 복합장치에서의 구현이 용이한 방법 및 장치를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

<38> 또한, 본 발명은 고온 안정성을 가진 DNA 중합효소 뿐만 아니라 고온 안정성을 가지지 않은 DNA 중합효소도 사용할 수 있는 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

<39> 그리고, 본 발명은 시료의 온도 변화공정을 없앴으로써 보다 효율적인 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공하는 것을 또 다른 목적으로 한다.

<40> 본 발명이 속한 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 명세서의 도면, 발명의 상세한 설명 및 특허청구범위로부터 본 발명의 다른 목적 및 장점을 쉽게 인식할 수 있다.

【발명의 구성】

- <41> 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은 다음과 같은 새로운 작동원리에 근거한 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법 및 장치를 제공한다.
- <42> 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 중합효소 연쇄반응을 이용하는 염기서열 증폭 방법에 있어서,
- <43> 증폭하고자 하는 특정 염기서열을 포함한 주형 DNA, DNA 중합효소, 삼인산화 데옥시아데노신, 삼인산화 데옥시시티신, 삼인산화 데옥시구아노신, 삼인산화 데옥시티미딘, 및 상기 특정 염기서열 부위의 3'말단에 각각 상보적인 염기서열을 가지는 최소 두 개 이상의 올리고핵산 프라이머를 포함하는 시료를 반응용기에 주입하는 단계;
- <44> 상기 시료 내의 복수의 특정 영역에 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열원을 열적으로 결합시키되, 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 상기 열원을 배치시킴으로써, 특정의 공간적 온도 분포를 시료 내에 유지시키는 단계; 를 포함하되,
- <45> 상기 특정의 공간적 온도 분포는 i) 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리하는 디내츄레이션 단계, ii) 상기 단일가닥 DNA가 상기 프라이머와 DNA-프라이머 복합체를 형성하는 어닐링 단계, iii) 상기 DNA-프라이머 복합체의 프라이머를 중합

반응에 의하여 연장하는 폴리머리제이션 단계가 일어날 수 있는 온도 조건을 가진 공간적 영역들을 포함하며, 열 대류에 의한 시료의 순환에 의하여 상기 디내츄레이션 단계, 어닐링 단계, 폴리머리제이션 단계를 순차적이고 반복적으로 발생시키는 온도 분포인 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법을 제공한다.

<46> 또한 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 중합효소 연쇄반응을 이용하는 염기서열 증폭 장치에 있어서,

<47> 시료 내의 복수의 특정 영역에 대하여 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열원을 포함하며,

<48> 상기 복수의 열원은 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 배치됨으로써 특정의 공간적 온도 분포를 시료 내에 유지시키며,

<49> 상기 특정의 공간적 온도 분포는 i) 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리하는 디내츄레이션 단계, ii) 상기 단일가닥 DNA가 상기 프라이머와 DNA-프라이머 복합체를 형성하는 어닐링 단계, iii) 상기 DNA-프라이머 복합체의 프라이머를 중합 반응에 의하여 연장하는 폴리머리제이션 단계가 일어날 수 있는 온도 조건을 가진 공간적 영역들을 포함하며, 열 대류에 의한 시료의 순환에 의하여 상기 디내츄레이션 단계, 어닐링 단계, 폴리머리제이션 단계를 순차적이고 반복적으로 발생시키는 온도 분포인 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치를 제공한다.

<50> 본 발명에서는 먼저, 시료가 담긴 반응용기 내에 다내츄레이션 단계, 어닐링 단계, 및 폴리머리제이션 단계가 순차적이고 반복적으로 일어날 수 있는 온도 조건을 가진 공간적 영역을 형성시킨다. 이를 달성하기 위하여, 상기 시료 내의 복수의 특정 영역에 대하여 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열원을 배치시키는데, 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 상기 열원을 배치시킨다. 그 결과, 상기 복수의 특정 온도의 영역간의 온도 기울기로부터 기인하는 자연적인 열 대류 현상에 의하여 각 온도 영역간의 시료의 순환이 일어나게 되고, 그에 의하여 다내츄레이션, 어닐링, 폴리머리제이션의 세 단계가 순차적으로 그리고 반복적으로 일어나게 됨으로써, 염기서열이 증폭되게 된다.

<51> 상기의 원리에 입각한 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법인 본 발명은, 그 장치의 구성에 있어서 다음과 같은 특징을 가진다. 첫째, 반응용기 내 시료의 복수의 특정 영역들을 선택된 온도상태로 유지할 수 있는 복수의 열원을 필요로 한다. 둘째, 상기 복수의 특정 온도 영역들 사이의 시료의 순환이 열 대류에 의해 일어나게 하기 위하여, 상대적으로 높은 온도의 영역이 상대적으로 낮은 온도의 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 하여야 한다. 즉, 고온 영역에서의 시료가 상대적으로 낮은 밀도를 가지게 되므로, 이로 인한 부력의 작용에 의하여 낮은 높이에 위치한 고온 영역에서 높은 높이에 위치한 저온 영역으로의 부력에 의한 시료의 이동 및 증

력의 영향에 의한 반대 방향으로의 시료의 이동이 유발됨으로써 온도차에 의한 자연적인 열 대류에 의해 상기 복수의 특정 온도 영역간의 시료의 순환이 자연적으로 일어나게 하여야 한다. 셋째, 상기 복수의 특정 영역의 온도는 디내츄레이션, 어닐링, 폴리머리제이션의 세 단계가 일어날 수 있는 공간적 영역이 시료 내에 형성되도록 선택되어야 하며, 동시에 열 대류에 의해 적절한 속도의 시료의 순환이 서로 다른 온도 영역간에 일어남으로써 상기 세 단계가 순차적이고 반복적으로 실행될 수 있도록 선택되어야 한다.

<52> 상술한 목적, 특징 및 장점들은 첨부된 도면과 관련한 다음의 상세한 설명을 통하여 보다 분명해 질 것이다. 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다. 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 상세히 설명한다.

<53> 도1은, 본 발명에 따른 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법의 작동원리를 보여주는 모식도이다. 도1에 보인 모식도의 경우는 한 쪽이 막힌 일자형 튜브를 반응기로 사용하고, 시료 내에 두 개의 특정 온도 영역(1, 2)을 형성하는 경우를 특정하여 예시하고 있으나, 도2의 예들에서 보인 바와 같이 변형된 모양의 반응용기를 사용하거나, 세 개 이상의 특정 온도 영역을 형성하는 등의 다양한 변형예가 가능함은 아래에 기술한 본 발명의 열 대류 방식의 염기서열 증폭방법의 작동원리

에 비추어 볼 때 통상적인 지식의 범주 내에서 자명하다고 할 것이다.

<54>

도1에 도시한 바와 같이 반응용기에 들어 있는 시료 내의 2개의 특정 영역(1, 2)에 직접적으로, 또는 반응용기의 벽을 통하여 간접적으로 열을 공급하거나 빼앗아 가는 2개의 열원(3, 4)을 열적으로 결합시킴으로써 시료 내에 공간적 온도 분포를 형성시켜 디내츄레이션, 어닐링, 폴리머리제이션의 중합효소 연쇄반응에 필요한 세 가지 단계가 일어날 수 있는 공간적 온도 분포가 형성되게 한다. 상기 2개의 온도가 다른 특정 영역(1, 2) 중 상대적으로 온도가 높은 영역(1)이 상대적으로 온도가 낮은 영역(2)보다 낮은 높이에 위치하게 함으로써, 온도차로부터 기인하는 시료의 밀도차를 발생시켜 고온 영역(1)의 낮은 밀도의 시료가 받는 부력과 저온 영역(2)의 높은 밀도의 시료가 받는 중력에 의해 자연적으로 시료의 열 대류가 발생하여 디내츄레이션, 어닐링, 폴리머리제이션 세 가지 반응 단계가 일어나는 공간 영역들 간에 시료의 순환이 자연적으로 일어나게 한다. 이와 같은 구성에 의하여 상기 세 가지 중합효소 연쇄반응의 단계들이 순차적으로 반복적으로 일어나게 하는 것이 가능하며, 이에 따라 중합효소 연쇄반응에 의한 DNA 염기서열이 증폭을 달성할 수 있다. 보다 구체적으로 작동 상태를 예시하면 다음과 같다.

<55>

예를 들어, 시료의 하층부에 위치한 특정 고온 영역(1)의 온도를 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리할 수 있는 온도 조건인 90 내지 94℃로 유지함으로써 디내츄레이션 단계가 이 특정 고온 영역에서 주로 일어나게 한다. 그리고, 시료의

상층부에 위치한 특정 저온 영역(2)의 온도를 프라이머의 어닐링 온도 영역인 35 내지 65℃로 유지하여 하층부의 특정 고온 영역에서 디내츄레이션된 DNA가 열 대류에 의해 상층부의 특정 저온 영역으로 이동하게 함으로써 단일가닥 DNA와 이에 상보적인 염기서열을 갖는 프라이머가 어닐링되어 DNA-프라이머 복합체를 형성하게 한다. 이러한 구성 하에서, 72℃에서 최적 활성도를 가지고 낮은 온도 영역까지 넓은 활성도를 가지는 것으로 알려진 *Taq* DNA 중합효소를 중합반응을 위하여 사용하는 경우, DNA-프라이머 복합체에 DNA 중합효소가 결합하여 프라이머를 연장(extention)하게 되는 폴리머리제이션 단계는 특정 저온 영역(2) 및 대류 영역(5)의 상층부에서 일어나게 된다. 따라서, 상기 특정 고온 영역(1)에서 상기 디내츄레이션 단계가 일차적으로 일어나고, 디내츄레이션된 DNA가 프라이머 존재 하에서 열 대류에 의해 상기 특정 저온 영역(2)으로 이동함으로써 어닐링 단계가 이차적으로 일어나게 되며, 어닐링에 의해 생성된 DNA-프라이머 복합체가 DNA 중합효소의 존재 하에서 열 대류에 의해 상기 특정 저온 영역(2)과 대류 영역(5)을 통과하는 과정 중에 마지막으로 상기 폴리머리제이션 단계가 일어나게 되며, 이에 따라 상기 디내츄레이션, 어닐링, 폴리머리제이션의 중합효소 반응의 3 단계가 순차적으로, 그리고 반복적으로 일어나게 되어 시료 DNA의 특정 부위 염기서열의 증폭을 효율적으로 달성하게 된다.

<56>

도2에 도시한 바와 같이 반응용기에 들어 있는 시료 내의 3개의 특정 영역에 복수의 열원을 열적으로 결합시킨 구성도 가능하다. 도2a는 두 개의 고온 영역(1,

1')과 하나의 저온 영역(2)을 형성시키도록 복수의 열원(3, 3', 4)을 배치시키는 구성을 나타내는 모식도이며, 도2b는 하나의 고온 영역(1)과 두 개의 저온 영역(2, 2')을 형성시키도록 복수의 열원(3, 4, 4')을 배치시키는 구성을 나타내는 모식도이다. 이 때 사용되는 상기 복수의 열원들은 구성의 목적에 따라 상기 특정 영역 별로 각각 배치되거나 또는 동일한 열원이 병용될 수도 있다. 도2a의 경우, 상기 두 개의 고온 영역(1, 1')이 각각 중합효소 연쇄반응 중 디내처레이션 단계와 풀리머리제이션 단계가 일어나도록 구성된다면, 상기 복수의 열원 역시 각각 그 단계에 가장 적합한 온도를 유지시키는 열원을 배치하여야 한다. 도2b의 경우, 상기 두 개의 저온 영역(2, 2')이 모두 중합효소 연쇄반응 중 어닐링 단계가 일어나도록 구성한다면, 상기 복수의 열원 중 두 가지(4, 4')는 동일한 열원을 병용하는 것이 더 바람직할 것이다. 또한, 도2b에 나타낸 모식도는, 본 발명의 방법에 의하여 시료의 유입부와 유출부가 분리된 반응용기의 구성이 가능함을 보여주고 있다.

<57>

본 발명의 효율을 향상시키기 위해서는, 각 단계의 반응이 충분히 일어나면서도 전체 반응시간을 단축시킬 수 있도록 열 대류의 속도를 적절하게 조절하는 것이 중요하다. 이는 a) 상기 특정 온도 영역간의 온도 기울기의 조절, b) 상기 반응용기의 내경의 조절, 및 c) 상기 반응용기의 재질의 변화 등을 통하여 달성할 수 있다. 열 대류 속도의 조절을 위하여 온도 기울기를 조절하는 방법으로는, 상기 특정 온도 영역 사이의 온도 차이를 조절하는 것이 가장 쉬우나, 중합효소 연쇄반응의 경우 상기 특정 온도 영역이 가지는 기능으로 인하여 그 온도 차이의 조절이 제

한적일 수밖에 없다. 그러므로, 상기 특정 고온 영역(1, 1')과 상기 특정 저온 영역(2, 2') 사이의 거리를 변화시켜서 동일한 효과를 얻게 되는데, 같은 온도 차이를 가지는 상기 특정 온도 영역 사이의 길이가 길수록 온도 기울기가 작아지고, 따라서 열 대류 속도가 감소하게 된다. 반응용기의 벽면과 시료 사이의 접착력(adhesion force)에 의한 저항력 역시 시료의 대류를 저해하는 요인이므로, 반응용기의 내경을 조절하여 열 대류의 속도를 조절할 수 있다. 시료와 접촉되는 반응용기의 표면적이 시료의 부피에 대비하여 클수록 상기 접착력에 의한 저항력이 증가하여 상기 열 대류의 속도가 감소하게 된다. 따라서, 반응용기의 내경을 조절함으로써 시료와 접촉되는 반응용기의 표면적을 조절하여 상기 열 대류의 속도를 조절할 수 있다. 시료와 반응용기의 벽면과의 접착력은 또한, 반응용기의 재질과도 밀접한 관계를 가지고 있다. 중합효소 연쇄반응은 수용액에서 진행되므로, 유리 등 친수성 재질에 비하여 폴리에틸렌, 폴리프로필렌 등 물과의 접착력이 약한 소수성 재질의 반응용기를 사용할 때 대류의 속도는 증가한다. 따라서 중합효소 연쇄반응의 반응속도론적 조건에 맞도록 상기의 조건들을 조합하여 반응용기를 구성함으로써, 본 발명의 효율을 더욱 향상시킬 수 있다.

<58>

도3은, 본 발명에 따른 염기서열 증폭 장치 중 실시예에 따른 단면도(3a) 및 사시도(3b)를 보여준다. 도3에 도시된 염기서열 증폭 장치는 가열장치 또는 냉각장치 또는 가열장치 및 냉각장치와 같은 온도 유지 수단을 포함하는 복수의 열원으로 구성된다. 바람직하게는 상기 복수의 열원 사이를 열적으로 차단시키는 단열

수단을 포함하여 구성될 수 있다. 본 실시예는, 시료의 특정 영역과 열적으로 결합되는 제 1 열원과 제 2 열원으로 구성되어 있다. 상기 제 1 열원은 열전도성 블록인 제 1 전도성 블록(101)과 제 1 전도성 블록에 열을 공급하는 장치인 전열방식의 가열장치(104)로 구성되어 있으며, 반응용기의 하부에 열적으로 접촉하여 시료의 하층부에 고온 영역을 형성하도록 구성되어 있다. 상기 제 2 열원은 열전도성 블록인 제 2 전도성 블록(102)과 제 2 전도성 블록 내부에 적정 온도의 물을 순환시켜 제 2 전도성 블록을 적정 온도로 유지시키는 순환형 항온 수조로 구성되어 있으며, 상기 제 2 전도성 블록(102)은 반응용기의 상부에 열적으로 접촉하여 시료의 상층부에 저온 영역을 형성하도록 구성되어 있다. 상기 제 2 전도성 블록(102)은 항온 수조로부터 물을 받아들이는 유입부(105), 상기 유입된 물을 유출하는 유출부(106), 상기 유입부(105)로 유입된 물을 제 2 전도성 블록(102) 내부로 순환시키기 위한 유체순환로를 포함하고 있으며, 상기 제 2 전도성 블록(102) 내의 유체 순환로는 도3에는 도시되어 있지 않지만, 상기 제 2 전도성 블록(102)에 열을 고르게 전달하도록 구성되어 있다는 것을 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 알 수 있다. 상기 전도성 블록(101, 102)의 재질은 열 전도성이 좋은 구리를 사용하였으며, 상기 제 1 전도성 블록(101)과 상기 제 2 전도성 블록(102)간의 직접적인 열교환을 차단시키기 위해서 양 블록 사이에 단열재(107)가 삽입되어 있다. 그리고, 상기 제 1 전도성 블록(101)과 상기 제 2 전도성 블록(102)은 반응용기를 수용하기 위한 수용부를 가지고 있는데, 상기 수용부는, 상기 제 1 전도성 블록(101)의 한쪽이 막힌 개구부(111)와, 상기 제 2 전도성 블록(102)의 관통구(11

2)와, 상기 단열재(107)의 관통구(117)에 의해 형성된 오목부로 구성되어 있다.

<59> 후술하는 <실험 1>, <실험 2>, 및 <실험 3>에서는, 시료의 하층부의 고온 영역이 94℃가 되도록 상기 전열방식 가열장치(104)의 가열 정도를 조절하였고, 시료의 상층부의 저온 영역이 45℃가 되도록 순환형 항온 수조의 물의 온도를 조절하였다.

<60> 본 발명은 도3에 도시된 염기서열 증폭 장치에 한정되는 것은 아니며, 다음과 같은 변형예가 있을 수 있다.

<61> 첫째, 상기 전도성 블록(101, 102)의 구성을 변형할 수 있다. 예를 들면, 제 1 전도성 블록(101)은 반응용기의 하부와 열적으로 접촉시키고, 제 2 전도성 블록(102)은 반응용기의 상부와 열적으로 접촉시키되 반응용기의 중간 부분을 공기와 접하도록 하거나, 제 3의 전도성 블록을 사용하여 반응용기의 중간 부분과 열적으로 접촉시킬 수도 있다. 또한, 도3의 경우와 달리 상기 복수의 전도성 블록으로부터 반응용기의 벽을 통하여 시료의 특정 영역으로 열이 전달되게 하는 대신, 시료와 상기 전도성 블록이 직접 열적으로 접촉하게 하는 구성도 가능하다.

<62> 둘째, 상기 전도성 블록의 재질을 변형할 수 있다. 도3의 실시예에서는 구리

로 된 전도성 블록(101, 102)을 사용하였지만, 이에 한정되는 것은 아니며 반응용기에 열을 전달 할 수 있는 물질은 어떠한 것이라도 가능하다. 예를 들면, 다른 전도성 고체나, 액체 또는 기체와 같은 유체를 상기 전도성 블록과 대체하여 사용할 수 있으며, 시료의 특정 영역을 적외선 등을 사용하여 직접 가열하는 방법을 사용함으로써 전도성 블록(101, 102)의 일부 또는 전부를 사용하지 않을 수 있다.

<63> 셋째, 도3에서 제 1 전도성 블록과 제 2 전도성 블록의 온도를 유지하는 온도 유지 수단이 순환형 항온 수조나 전열 방식의 가열장치에 한정되는 것은 아니며, 적절한 양의 열을 공급하거나 빼앗아 갈 수 있는 것은 어떠한 것이라도 사용 가능하다.

<64> 넷째, 도3의 단열부재(107) 대신 고체, 액체, 또는 기체 등 전도물질간의 열을 차단시키는데 적합한 어떠한 수단도 사용할 수 있으며, 상기 단열부재를 사용하지 않는 구성도 가능하다.

<65> 다섯째, 도1에서 사용된 반응용기 대신에 열 대류가 용이하게 일어나도록 변형된 반응용기(예를 들면 도2a, 도2b와 같은 반응용기)를 사용하는 경우, 본 발명의 사상에 적합하게 변형된 상기 전도성 블록 및 그 변형예를 포함한 복수의 열원을 구성하여 사용할 수 있다.

<66> 상기 첫째, 둘째, 및 셋째의 경우는 열원의 구성 중 그 일부분을 변형한 예로서 특히 전도성 블록을 변형한 경우이다. 본 명세서에서 열원은 시료를 특정의 온도로 유지시키는 수단을 통칭하며, 따라서, 상술한 열원의 변형에 외에도 시료의 특정 영역을 특정 온도로 유지시킬 수 있는 기능을 가진 장치라면 어떠한 구성이라도 본원 발명에서 열원으로써 사용될 수 있다. 시료의 특정 영역을 특정 온도로 유지시킬 수 있는 기능을 가진 장치라면 어떠한 구성도 본원 발명의 범위에 포함되는 것이며, 본원 발명의 특징이 열원의 구체적인 구성에 있는 것이 아니고 시료내에서 중합효소 연쇄반응이 순차적이고 반복적으로 수행될 수 있는 공간적인 온도 분포를 만들기 위해서 열원을 특이하게 배치시킨 점에 있기 때문이다. 상기 변형예들의 보다 구체적인 구성은 산업 현실에 따라서 다양하게 변형될 수 있는 것이므로, 더 상세한 설명은 생략한다.

<67> 도4는 반응용기 내의 시료의 반응용기 바닥으로부터의 높이에 따른 온도 분포도로서, 열 대류를 이용하여 PCR 반응이 일어나는 원리를 보여준다. 열 대류(thermal convection)는 유체가 온도차에서 비롯된 밀도차로 자연적으로 이동하는 현상이다. 특히 이를 자연대류(natural convection)라 하며, 이는 펌프나 프로펠러 등을 이용하여 강제로 유체를 이동시키는 강제대류(forced convection)와는 구별된다. 본 명세서에서의 대류는 모두 자연대류를 의미한다. 반응용기 내에서 자연대류가 발생하기 위해서는, 반응용기내 시료의 상층부의 온도보다 하층부의 온도가 높

아야 된다.

<68>

도4에서 알 수 있듯이, 반응용기의 하부와 접촉하는 제 1 전도성 블록(101)을 96℃로 유지하고 반응용기의 상부와 접촉하는 제 2 전도성 블록(102)을 45℃로 유지시킨 경우에, 반응용기 내의 시료에는 고온 영역(도4에서 90℃ 이상 영역), 저온 영역(도4에서 50℃ 부근의 영역), 및 대류 영역(도4에서 온도의 기울기가 존재하는 영역)이 형성된다. 상기 고온 영역에서 시료는 주로 디내츄레이션 단계를 거치고, 상기 디내츄레이션 단계를 거친 시료는 대류 영역을 통하여 상기 저온 영역으로 이동되어 어닐링 단계를 거치게 되며, 시료가 상기 저온 영역에 있는 동안과 저온영역으로부터 대류 영역으로 돌아오는 동안 폴리머리제이션 단계를 거치게 된다. 열 대류에 의한 상기 3 개 영역간의 시료의 순환에 의하여, 상기 3 가지 단계가 순차적이고 반복적으로 수행됨으로써 중합효소 연쇄반응에 의한 염기서열 증폭이 달성되게 된다.

<69>

도7은 고체의 표면에 고정화한 DNA 중합효소를 사용한 결과를 보여주고 있다. 열 대류 방식의 염기서열 증폭 방법인 본 발명에서는 DNA 중합효소를 사용함에 있어서, *Taq* 중합효소 등 고온 안정성 효소를 사용하는 외에 클레나우 프래그먼트(Klenow fragment) 나 T7 DNA 중합효소와 같이 고온 안정성을 가지지 않은 효소도 사용할 수 있다. 이는 본 발명의 특성상 전체 시료의 온도가 고온과 저온으로 반복적으로 변화하는 것이 아니라, 시료내 특정 영역 별로 온도가 유지되기 때문이

다. 즉, 시료의 하층부는 계속 고온 영역으로 유지되는 반면, 시료의 상층부는 계속 저온 영역으로 유지되고 있으므로, 이러한 저온 영역 또는 저온 영역에 가까운 대류 영역의 상층부에 DNA 중합효소를 고정화함으로써, 고온 안정성을 가지지 않은 효소의 사용이 가능하게 된다.

<70> 본 발명인 염기서열 증폭 장치를 사용하여, 본 발명의 목적을 달성할 수 있다는 것을 다음의 실험 1, 2, 3의 예를 통하여 확인하였다.

<71> <실험 1>

<72> 1. 실험조건

<73> 1.1 반응용기

<74> 반응용기로서 한쪽이 막힌 유리관을 사용하였으며, 유리관의 길이는 55~60 mm이고, 내경은 2 mm이고, 외경이 8 mm이며, 막힌 쪽 바닥 면의 유리 두께는 약 3 mm이다. 유리관 내벽은 스프레이 방식의 폴리 테트라 플루오로 에틸렌 (Polytetrafluoroethylene) 코팅제로 코팅하고 열경화시켜 표면 처리하여 사용하였다.

<75> 1.2 시료

<76> pBluescript II KS(+)를 주형 DNA로 사용하였다. PCR 반응에 사용된 시료는 주형 DNA가 40 ng, T3 프라이머(5'-ATTAACCCTCACTAAAG-3') 및 T7 프라이머(5'-AATACGACTCACTATAG-3')가 각각 40 pmol씩 포함되어 있고, 4 nmol의 dNTP 혼합물질, 1 pmol (5 U)의 *Taq* DNA 중합효소(*Taq* DNA polymerase), 그리고 250 nmol 염화마그네슘, 50 mM의 염화칼륨이 포함된 전체 부피 100 μ l인 pH 8.3의 10 mM 트리스 완충 용액이 되도록 제조하여 사용하였다.

<77> 1.3 반응온도와 반응시간

<78> 먼저 아래쪽 제 1 전도성 블록(101)은 전열 방식 가열 장치를 가열하여 96°C로 유지하였고, 위쪽 제 2 전도성 블록(102)은 순환형 항온 수조를 사용하여 45°C로 유지하였다. 상기의 반응용기에 상기의 방법으로 준비한 시료를 주입하여 수용부(111, 117, 112)에 끼워 넣고, 적정 시간 동안 반응시켰다. 이때, 반응용액이 끓는 것을 방지하기 위해 질소 기체를 가하여 1.2 기압 정도의 압력을 유지하였다.

<79> 1.4 반응용기 내 시료의 온도 분포 측정

<80> 상기의 반응 조건에서 반응용기 내 시료의 각 영역에 대한 온도를 측정하였다. 열전쌍(thermocouple)을 이용하는 온도계의 열전쌍 끝이 반응용기 바닥에서부터 2.5 mm 씩 상승하는 곳에 위치하도록 담그고, 충분한 시간이 경과한 후 온도를

측정하여 기록하였다. 반응용기 내 시료의 온도 분포를 측정한 예는 도4에 도시된 바와 같다.

<81>

2. 실험결과

<82>

우선, 상기 반응 조건에서 반응용기 내 시료의 각 영역에서 온도 변화를 측정한 결과, 시료 내의 온도 분포는, 디내츄레이션이 일어날 수 있도록 90℃ 이상이 유지되는 고온 영역, 어닐링이 일어날 수 있도록 50℃로 유지되는 저온 영역, 그리고, 그 사이에서 열 대류가 일어날 수 있도록 온도 기울기가 형성되는 대류 영역이 형성됨을 확인할 수 있었다(도4 참조). 폴리머리제이션은 상기 저온 영역 및 대류 영역의 상층부에서 일어나게 될 것으로 예상할 수 있다.

<83>

상기 반응 조건에서 시료를 일정한 반응시간 동안 그대로 방치해 두었다가 반응용기를 꺼내어 식힌 다음, 반응 생성물을 1.0% 아가로스 젤(agarose gel)로 전기영동시켜 확인하였다. 도5는, 반응시간을 30분 간격으로 4시간까지 변화시키면서 얻은 결과를 보여주는 전기 영동사진이다. 반응 생성물은 164 bp의 이중나선 DNA이다. 도5에서 알 수 있듯이, 90분 이전에 PCR 반응이 포화되기 시작했음을 알 수 있다.

<84> <실험 2>

<85> 1. 실험조건

<86> T3/T7 프라이머 쌍 외에 KS/U 프라이머 쌍, KS/*Pvu*II 프라이머 쌍, KS/*Nae* I 프라이머 쌍을 각각 사용하여 실험하였다. 반응은 150분간 진행시켰으며, 나머지 실험조건은 상기 실험 1의 조건과 동일하게 하였다. T3, T7 프라이머의 서열은 실험 1에서 기술한 바와 같으며, 나머지 프라이머들의 서열은 다음과 같다.

<87> KS 프라이머; 5'-CGAGGTCGACGGTATCG-3'

<88> U 프라이머; 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

<89> *Pvu*II 프라이머; 5'-TGGCGAAAGGGGGATGT-3'

<90> *Nae* I 프라이머; 5'-GGCGAACGTGGCGAGAA-3'

<91> 2. 실험결과

<92> 상기 실험 1처럼, 전기영동법을 사용하여 반응 생성물을 확인하였다. 도6은 실험 2의 결과를 보여주는 전기 영동사진으로 레인 1, 2, 3 및 4는 각각 T3/T7 프라이머 쌍, KS/U 프라이머 쌍, KS/*Pvu*II 프라이머 쌍, KS/*Nae* I 프라이머 쌍으로 증폭한 결과로서, 각각 164 bp, 144 bp, 213 bp, 413 bp의 크기가 맞는 이중나선

DNA가 생성됨을 확인할 수 있다.

<93> <실험 3>

<94> 1. 실험조건

<95> 시료에 *Taq* DNA 중합효소를 넣는 대신, *Taq* DNA 중합효소를 금 와이어 표면에 고정시키고 이를 저온 영역에 위치시켜서 실험하였다. 나머지 실험조건은 상기 실험 1의 조건과 동일하게 하였다.

<96> 2. 실험결과

<97> 상기 실험 1처럼, 전기영동법을 사용하여 반응 생성물을 확인하였다. 도7은, 반응시간을 30분 간격으로 4시간까지 변화시키면서 얻은 결과를 보여주는 전기 영동사진이다. 도7에서 알 수 있듯이, 150분 이전에 PCR 반응이 포화되기 시작했음을 알 수 있다.

<98> 상기 <실험 1>, <실험 2>, 및 <실험 3>의 결과를 통하여 다음과 같은 점을 알 수 있다.

<99> 첫째, 본 발명인 열 대류를 이용한 염기서열 증폭 장치가 효과적으로 작동된다.

<100> 둘째, 본 발명인 열 대류를 이용한 염기서열 증폭 장치에서는, 저온 영역 또는 대류 영역의 상승부에 고체 표면에 고정된 DNA 중합효소를 위치시켜 PCR 반응을 수행할 수 있음을 확인함으로써, 고온에서 안정성을 갖지 않은 DNA 중합효소도 사용할 수 있음을 확인하였다.

<101> 이상에서 설명한 본 발명은 전술한 실시예 및 첨부된 도면에 의해 한정되는 것이 아니고, 본 발명의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 여러 가지 치환, 변형 및 변경이 가능하다는 것이 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 명백하다. 그 때문에, 전술한 실시예와 변형예들은 모든 점에서 단순한 예시에 지나지 않으며, 한정적으로 해석되어서는 안된다. 본 발명의 범위는 특허청구범위에 의해서 나타나는 것으로서, 명세서 본문에 의해서는 아무런 구속도 되지 않는다.

【발명의 효과】

<102> 상기한 바와 같이, 본 발명에서는 시료 내의 복수의 특정 영역들이 서로 다른 특정 온도로 유지되고 상기 특정 영역간의 열 대류에 의해 시료가 반응용기내에

서 순환됨으로써 디내추레이션 단계, 어닐링 단계, 폴리머리제이션 단계가 순차적이고 반복적으로 수행될 수 있으므로, 다음과 같은 효과가 있다.

<103> 첫째, 염기서열 증폭 장치의 구성을 간단히 할 수 있다. 본 발명은, 시료의 온도를 변화시키는 공정이 필요 없기 때문에 종래의 염기서열 증폭 장치에서는 반드시 필요한 온도 변화 및 조절을 위한 복잡한 장치의 사용을 배제시킴으로써, 보다 간단하게 구성할 수 있다.

<104> 둘째, PCR 염기서열 증폭 공정을 수행하는 장치를 소형화하거나, 랩온어칩과 같은 복합장치에 집적시키기가 용이하며, 온도 변화가 바람직하지 않은 장치에도 사용할 수 있다.

<105> 셋째, 고온 안정성을 가지지 않은 DNA 중합효소도 사용할 수 있다. 본 발명에서는, 반응용기의 특정 영역을 DNA 중합효소가 활성화되는 온도로 유지시키고 DNA 중합효소를 활성화되는 온도 영역에 고정화하여 사용할 수 있기 때문이다. 본 발명에 따르면, 고정화된 DNA 중합효소를 사용할 경우 중합효소를 활성 온도에 고정시킨 채로 PCR 반응을 시킬 수 있으므로, 저온에서 최적 활성을 가지는 클레나우 프래그먼트(Klenow fragment) 나 T7 DNA 중합효소와 같은 효소도 PCR 반응에 사용할 수 있다.

<106>

넷째, PCR 반응 시간을 단축시킬 수 있다. 본 발명에서는, 시료 전체의 온도를 변화시킬 필요가 없으므로, 온도 변화 및 조절을 위하여 소모되는 시간을 절약할 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

중합효소 연쇄반응을 이용하는 염기서열 증폭 방법에 있어서,

증폭하고자 하는 특정 염기서열을 포함한 주형 DNA, DNA 중합효소, 삼인산화 데옥시아데노신, 삼인산화 데옥시시티신, 삼인산화 데옥시구아노신, 삼인산화 데옥시티미딘, 및 상기 특정 염기서열 부위의 3'말단에 각각 상보적인 염기서열을 가지는 최소 두 개 이상의 올리고핵산 프라이머를 포함하는 시료를 반응용기에 주입하는 단계;

상기 시료 내의 복수의 특정 영역에 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열원을 열적으로 결합시키되, 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 상기 열원을 배치시킴으로써, 특정의 공간적 온도 분포를 시료 내에 유지시키는 단계;를 포함하되,

상기 특정의 공간적 온도 분포는 i) 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리하는 디내츨레이션 단계, ii) 상기 단일가닥 DNA가 상기 프라이머와 DNA-프라이머 복합체를 형성하는 어닐링 단계, iii) 상기 DNA-프라이머 복합체의 프라이머를 중합반응에 의하여 연장하는 폴리머리제이션 단계가 일어날 수 있는 온도 조건을 가진 공간적 영역들을 포함하며, 열 대류에 의한 시료의 순환에 의하여 상기 디내츨레이션 단계, 어닐링 단계, 폴리머리제이션 단계를 순차적이고 반복적으로 발생시키는

온도 분포인 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기 또는 상기 시료의 특정 영역에 열적으로 접촉되는 열전도성 고체; 및 상기 열전도성 고체에 대하여 열을 공급하는 가열장치 또는 열을 빼앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기의 특정 영역에 열적으로 접촉되는 액체; 상기 액체를 수용하는 수용부; 및 상기 액체에 대하여 열을 공급하는 가열장치 또는 열을 빼앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 열원은 상기 액체를 반응용기 주위로 순환시키는 순환장치를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기의 특정 영역에 열적으로 접촉되는 기체; 상기 기체에 대하여 열을 공급하는 가열장치 또는 열을 빼앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치; 및 상기 기체를 상기 반응용기 주위로 순환시키는 순환장치; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

【청구항 6】

제 1 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 시료에 직접 열을 공급하는 적외선 발생장치임을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

【청구항 7】

제 1 항에 있어서, 상기 복수의 열원 사이를 열적으로 차단시키는 단열수단을 사용하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 방법.

【청구항 8】

중합효소 연쇄반응을 이용하는 염기서열 증폭 장치에 있어서,
 시료 내의 복수의 특정 영역에 대하여 열을 공급하거나 또는 열을 빼앗는 복수의 열원을 포함하며,

상기 복수의 열원은 상기 시료 내의 복수의 특정 영역 중 상대적으로 높은 온도로 유지되는 영역이 상대적으로 낮은 온도로 유지되는 영역보다 낮은 높이에 위치하도록 배치됨으로써 특정의 공간적 온도 분포를 시료 내에 유지시키며,

상기 특정의 공간적 온도 분포는 i) 이중가닥 DNA를 단일가닥 DNA로 분리하는 디내츰레이션 단계, ii) 상기 단일가닥 DNA가 상기 프라이머와 DNA-프라이머 복합체를 형성하는 어닐링 단계, iii) 상기 DNA-프라이머 복합체의 프라이머를 중합 반응에 의하여 연장하는 폴리머리제이션 단계가 일어날 수 있는 온도 조건을 가진 공간적 영역들을 포함하며, 열 대류에 의한 시료의 순환에 의하여 상기 디내츰레이션 단계, 어닐링 단계, 폴리머리제이션 단계를 순차적이고 반복적으로 발생시키는 온도 분포인 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

【청구항 9】

제 8 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기 또는 상기 시료의 특정 영역에 열적으로 접촉되는 열전도성 고체; 및 상기 열전도성 고체에 대하여 열을 공급하는 가열장치 또는 열을 빼앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

【청구항 10】

제 8 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기의 특

정 영역에 열적으로 접촉되는 액체; 상기 액체를 수용하는 수용부; 및 상기 액체에 대하여 열을 공급하는 가열장치 또는 열을 빼앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

【청구항 11】

제 10 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 열원은 상기 액체를 반응용기 주위로 순환시키는 순환장치를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

【청구항 12】

제 8 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 반응용기의 특정 영역에 열적으로 접촉되는 기체; 상기 기체에 대하여 열을 공급하는 가열장치 또는 열을 빼앗는 냉각장치 또는 상기 가열장치와 상기 냉각장치; 및 상기 기체를 상기 반응용기 주위로 순환시키는 순환장치; 를 포함하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

【청구항 13】

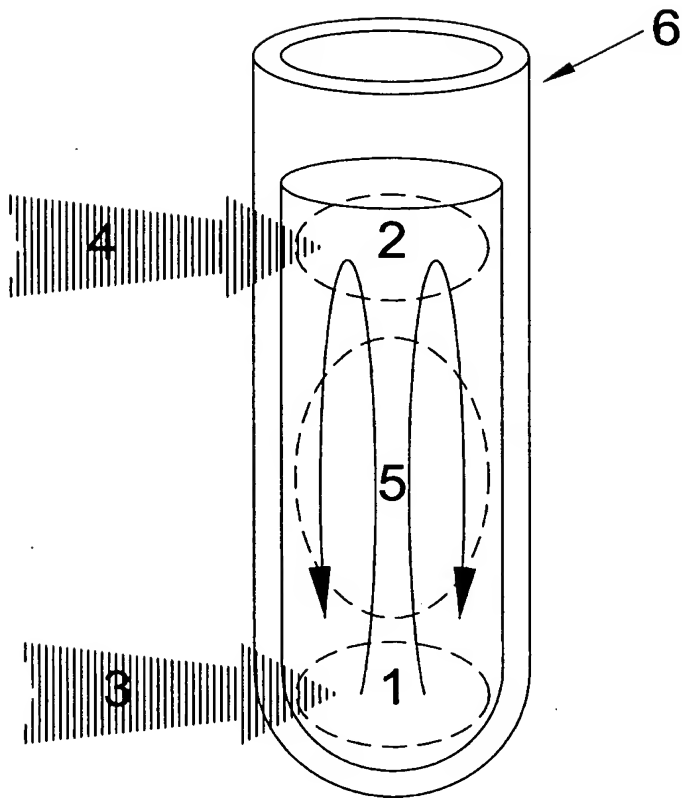
제 8 항에 있어서, 상기 열원 중 적어도 하나의 열원은 상기 시료에 직접 열을 공급하는 적외선 발생장치임을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

【청구항 14】

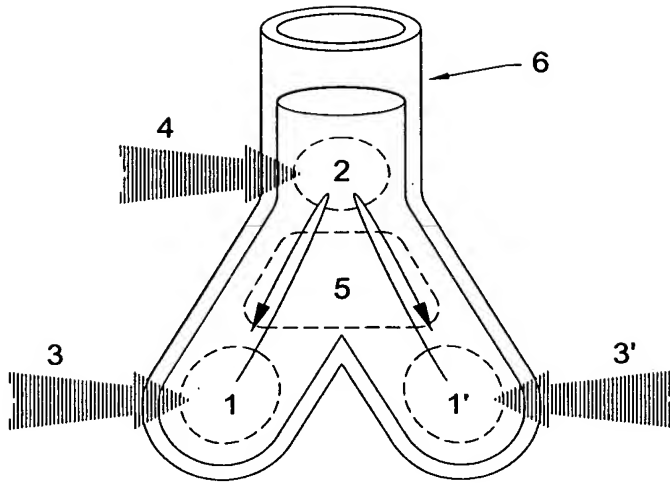
제 8 항에 있어서, 상기 복수의 열원 사이를 열적으로 차단시키는 단열수단을 사용하는 것을 특징으로 하는 염기서열 증폭 장치.

【도면】

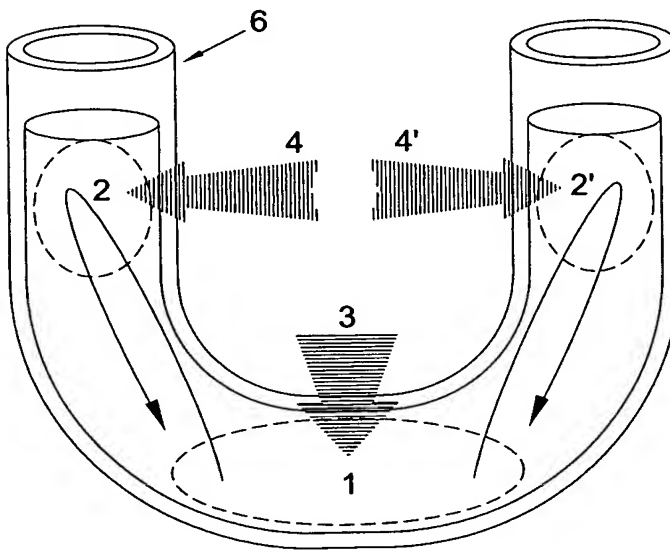
【도 1】



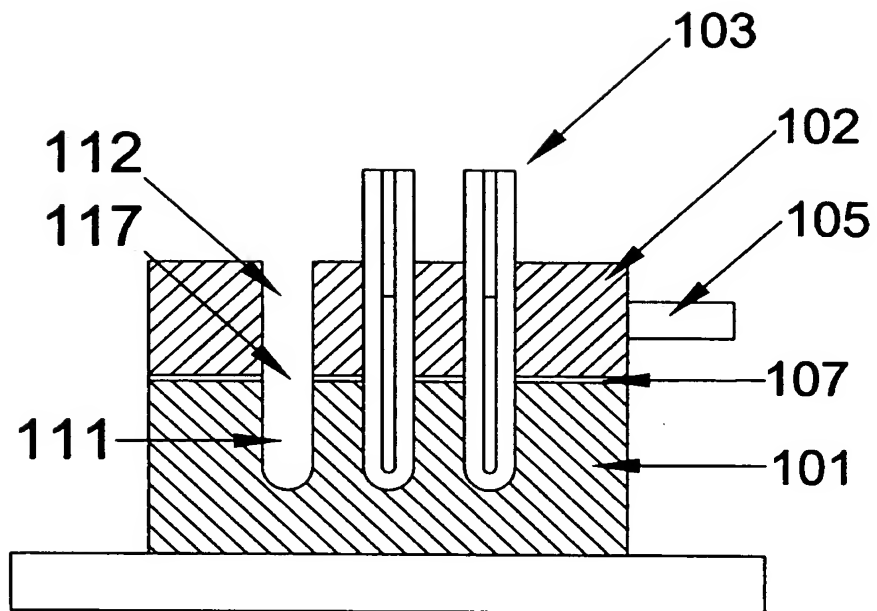
【도 2a】



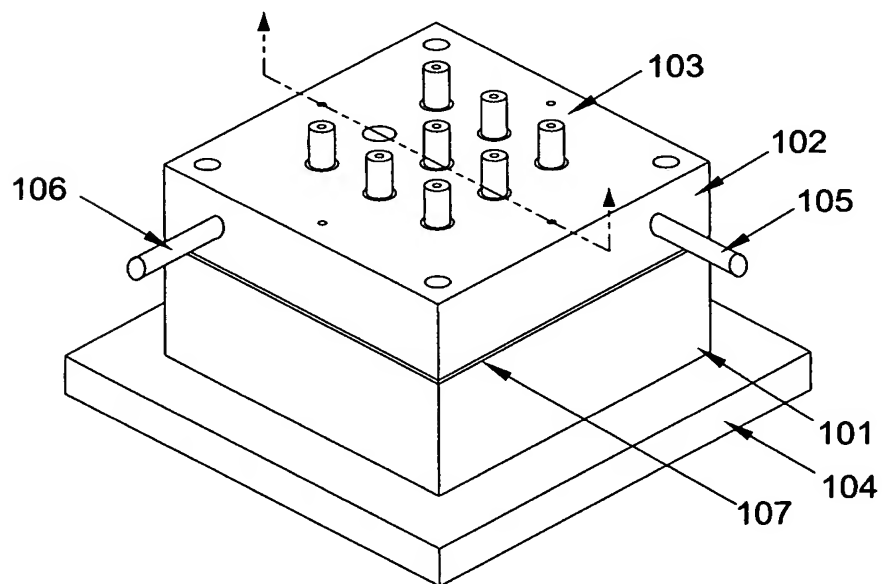
【도 2b】



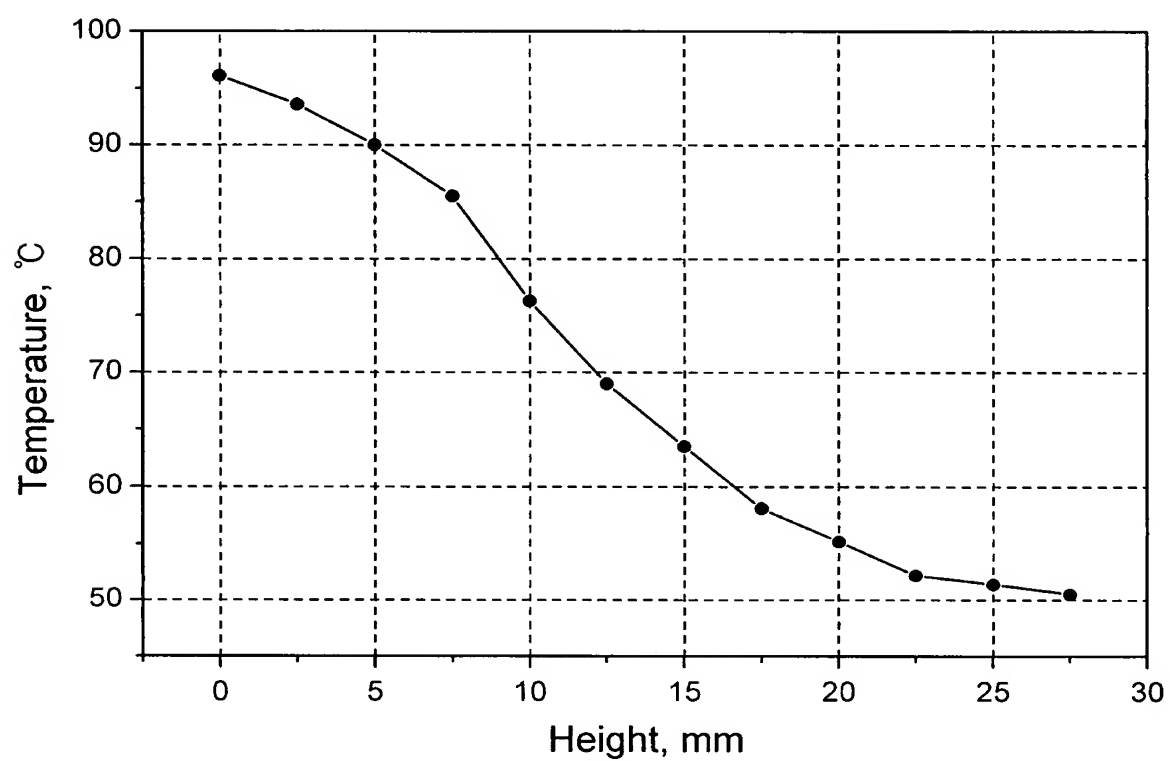
【도 3a】



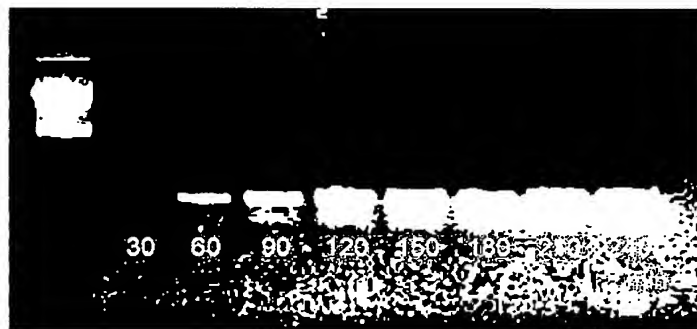
【도 3b】



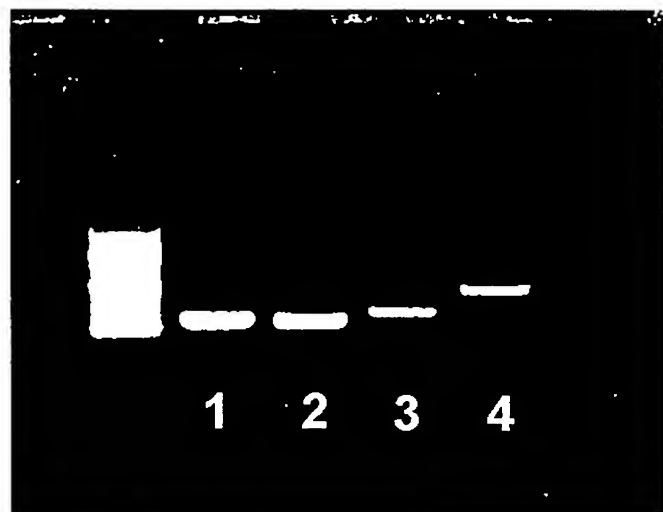
【도 4】



【도 5】



【도 6】



【도 7】

